



**UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA**



**DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE**

**CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA**

**“MATERIALI PIEZOELETTRICI PER LA RIGENERAZIONE DELLA  
CARTILAGINE”**

**Relatore: Prof. Andrea Bagno**

**Laureanda: Elisa Simioni**

**ANNO ACCADEMICO 2022 – 2023**

**Data di laurea: 19 luglio 2023**



## Indice

Abstract	3
Introduzione	5
Capitolo 1: La cartilagine	7
1.1 Caratteristiche del tessuto cartilagineo	7
1.2 Tipi di cartilagine	8
1.2.1 Cartilagine ialina	9
1.2.2 Cartilagine elastica	10
1.2.3 Cartilagine fibrosa	10
1.3 Cartilagine articolare	11
1.3.1 Anatomia e composizione strutturale	11
1.3.2 Proprietà meccaniche e funzioni	15
Capitolo 2: Le cause della degenerazione cartilaginea e i trattamenti chirurgici in uso	18
2.1 Patologie	18
2.1.1 Osteoartrite	18
2.1.2 Artrite reumatoide	20
2.2 Eventi traumatici	21
2.3 Riparazione della cartilagine	22
2.4 Interventi chirurgici	23
2.4.1 Terapie chirurgiche	23
2.4.2 Limiti delle tecniche chirurgiche attuali	26
2.5 Ingegneria tissutale: una metodologia innovativa	28
Capitolo 3: La piezoelettricità	30
3.1 Caratteristiche dei materiali piezoelettrici	30
3.2 Coefficienti piezoelettrici	33
3.3 Piezoelettricità nella fisiologia della cartilagine umana	34
Capitolo 4: I materiali piezoelettrici per la rigenerazione della cartilagine	37
4.1 Materiali polimerici piezoelettrici	37
4.1.1 Polimeri naturali	38
4.1.2 Polimeri sintetici	40
4.2 Materiali ceramici piezoelettrici	44
4.3 Materiali piezoelettrici compositi	47

Capitolo 5: L'ingegneria tissutale applicata al tessuto cartilagineo attraverso l'uso dei materiali piezoelettrici	48
5.1 Scaffold	48
5.1.1 Ruolo e funzione	48
5.1.2 Configurazioni	49
5.1.3 Tecniche di produzione	51
5.1.4 Caratterizzazione meccanica, chimica, biologica	54
5.2 Cellule	57
5.2.1 Condrociti	57
5.2.2 Cellule staminali	58
5.3 Fattori stimolanti esterni	60
5.3.1 Ultrasuoni	60
Capitolo 6: Le sperimentazioni e il futuro utilizzo dei materiali piezoelettrici	62
6.1 Sperimentazioni in vitro	62
6.2 Sperimentazioni in vivo	68
6.3 Approvazione clinica	71
6.4 "Medicina rigenerativa": approccio autologo	74
Conclusioni	78
Bibliografia	80

## **Abstract**

Il tessuto cartilagineo è caratterizzato da una scarsa capacità di autorigenerazione. Di conseguenza l'usura e le malattie degenerative associate a questo tessuto possono provocare danni permanenti alle articolazioni. Negli anni si sono sviluppati diversi trattamenti al fine di arrestare il processo degenerativo e di rigenerare il tessuto, ma non si sono ottenuti risultati soddisfacenti; le odierne soluzioni chirurgiche mostrano infatti delle limitazioni. Per questo, nell'ambito della Tissue Engineering, una nuova disciplina che si basa sull'uso di cellule autologhe seminate su opportuni supporti, una svolta è rappresentata dall'uso dei biomateriali piezoelettrici. Questi biomateriali rispondono agli stimoli meccanici generando un campo elettrico, comportandosi come dei microelettrostimolatori per le cellule che devono differenziarsi in condrociti per produrre nuova cartilagine. La loro applicazione diventa quindi molto significativa in regioni in cui il carico meccanico è predominante. Lo studio e la ricerca su questi materiali hanno mostrato ottimi risultati sperimentali e, se verranno confermati anche nell'uomo, potranno diventare la base per un approccio terapeutico rivoluzionario nell'ambito della medicina rigenerativa della cartilagine, così come in altri tipi di tessuto.



## **Introduzione**

Le lesioni alla cartilagine articolare, dovute a malattie degenerative o a traumi, rappresentano un problema attuale per un numero consistente di persone e per questo sono state proposte varie tecniche di riparazione per ripristinare la normale funzionalità delle articolazioni danneggiate. Per esempio, l'osteoartrosi è una delle maggiori cause di dolore nelle persone adulte e anziane e, in Europa, quasi 40 milioni di cittadini, ne soffrono: ciò ha reso la rigenerazione cartilaginea e ossea una tematica rilevante in ambito biomedico.

Le diverse cause del deterioramento della cartilagine hanno stimolato la ricerca di trattamenti efficaci per curarne la comparsa o prevenirla. L'emergere di una nuova disciplina, come l'ingegneria dei tessuti, ha dato grande speranza nell'ambito scientifico e si è pensato di usare proprio i principi di tale disciplina al fine di trattare le lesioni della cartilagine. Insieme alla pelle, la cartilagine è stata uno dei primi tessuti che si sono studiati in questo ambito a causa della sua apparente semplicità; tuttavia il tessuto cartilagineo possiede una struttura e una composizione unica, che sono difficili da riprodurre in laboratorio. La più grande motivazione per cui si sono riposte tante speranze nell'uso del Tissue Engineering nella riparazione della cartilagine danneggiata consiste nella sua incapacità di autoriparazione, conseguente all'assenza di vasi sanguigni, di vasi linfatici e di nervi. L'ingegneria tissutale offre un'alternativa alle tecniche attualmente in uso ed i suoi principi consistono nell'uso di cellule autologhe per la formazione di tessuto in vitro. Inizialmente era stato considerato solo l'impianto delle cellule coltivate in vitro, ma con gli anni è stato introdotto un nuovo metodo che permette la cultura delle cellule su un materiale biodegradabile, denominato scaffold, che funge da struttura portante per la crescita del tessuto. I passaggi fondamentali dell'ingegneria tissutale si possono riassumere in tre punti: prelievo di cellule, produzione di uno scaffold ed eventuale stimolazione esterna.

Nel caso specifico della cartilagine, sono stati proposti diversi metodi di formazione di nuovo tessuto con l'utilizzo di materiali piezoelettrici. Fondamentale è la scelta di biomateriali opportuni che posseggano buone proprietà meccaniche e un tasso di riassorbimento controllato. È poi necessario considerare attentamente la fonte delle cellule utilizzate e i metodi di coltura sfruttati per assicurarne l'espansione, la preservazione della vitalità e un'efficiente attività.





# **CAPITOLO 1    La cartilagine**

## **1.1 Caratteristiche del tessuto cartilagineo**

Il tessuto cartilagineo, assieme al tessuto osseo, fa parte dei tessuti connettivi di sostegno (o tessuti scheletrici), i quali derivano dalle cellule staminali mesenchimali (MSCs). Da queste cellule staminali multipotenti, cioè in grado di generare solo un tipo di cellule in questo caso quelle del tessuto connettivo, si differenziano i fibroblasti, denominati condroblasti nel caso del tessuto connettivo cartilagineo, e osteoblasti nel caso del tessuto connettivo osseo: essi producono fibre di collagene e matrice extracellulare ricca di glicosamminoglicani in diversa quantità. Da condroblasti e osteoblasti derivano poi le cellule cartilaginee (condrociti) o ossee (osteociti). Le differenze strutturali e funzionali di entrambi i tessuti di sostegno sono soprattutto da ricondurre a differenze nella composizione chimica della sostanza fondamentale e nel contenuto di fibre di collagene [1].

La resistenza alla compressione e l'elasticità sono le proprietà funzionali caratteristiche della cartilagine [2]. La consistenza semirigida e gelificata rende questo tessuto adatto a supportare sollecitazioni meccaniche senza subire deformazioni permanenti e a sostenere strutturalmente svariati tessuti molli dell'organismo. Queste caratteristiche sono associate alla struttura del tessuto cartilagineo, composto da un'abbondante matrice extracellulare (ECM) e da condrociti. La matrice extracellulare è costituita da fibre immerse in una matrice amorfa: in particolare sono presenti eteropolisaccaridi, proteine fibrose (come il collagene e l'elastina), glicosamminoglicani (GAGs) e proteoglicani, assieme a molte glicoproteine. Le importanti proprietà meccaniche della cartilagine si basano principalmente sulla composizione della sostanza intercellulare [1]. La resistenza alla deformazione dovuta a sollecitazioni da compressione è dovuta alla disposizione delle fibre di collagene e all'alto contenuto di glicosamminoglicani nella sostanza fondamentale amorfa, che conferiscono al tessuto solidità: quest'aspetto la differenzia dalla matrice dei tessuti connettivi propriamente detti [2]. Anche se è relativamente rigida, la cartilagine presenta un contenuto d'acqua che varia dal 60% all'80%, associato alla presenza dei proteoglicani, i quali conferiscono proprietà elastiche al tessuto [3]. La matrice è sintetizzata dai condroblasti, i quali vengono da essa circondati e intrappolati in delle cavità, dette lacune. Queste cellule prendono poi il nome di condrociti quando si trovano e sono chiuse all'interno delle lacune [3]. I condrociti, che possono presentarsi isolati o riuniti in gruppi (gruppi isogeni), sono le uniche cellule del tessuto cartilagineo; essi sono costituiti da un ampio citoplasma ricco di organuli, un elaborato reticolo endoplasmatico rugoso e uno

sviluppato apparato di Golgi, indicatori morfologici di un'ampia sintesi di proteine e carboidrati per la formazione di fibre e glicosamminoglicani [1].

La formazione della cartilagine, detta condrogenesi, trae origine dal tessuto connettivo mesenchimale, da cui deriva anche il tessuto osseo. Infatti, nello sviluppo biologico dell'uomo e di tutti i mammiferi, la cartilagine è il precursore dello scheletro osseo: il tessuto cartilagineo viene in gran parte sostituito dal tessuto osseo, tranne che in alcune zone come le superfici delle articolazioni e nello scheletro di sostegno di orecchio esterno, naso, laringe, trachea e bronchi [2].

Poiché il tessuto cartilagineo non è vascolarizzato, è proprio sulla diffusione di sostanze attraverso la matrice altamente idratata che si basano l'apporto di nutrienti e lo smaltimento dei prodotti di rifiuto del metabolismo cellulare [1]. Per questo motivo, in tutte le zone in cui si trova, ad eccezione delle superfici articolari, la cartilagine è rivestita da una densa guaina di tessuto connettivo fibroso, il pericondrio, che contiene vasi sanguigni con il compito di nutrire le cellule cartilaginee per diffusione. Il rifornimento vascolare per la cartilagine avviene perciò solo attraverso il pericondrio o attraverso il liquido sinoviale contenuto nelle cavità articolari: per questo motivo la cartilagine ha uno spessore limitato.

Oltre ad essere un tessuto non vascolarizzato, la cartilagine è priva di nervi e vasi linfatici [4]. L'accrescimento della cartilagine può avvenire dall'esterno, tramite proliferazione e differenziazione dei condroblasti del pericondrio: questo processo è chiamato accrescimento per apposizione ed è il più comune; la differenziazione è regolata dalle proteine morfogenetiche dell'osso (BMPs). Ad esso si contrappone l'accrescimento interstiziale, che avviene dall'interno e nella matrice non ancora consolidata; esso è dovuto alla divisione mitotica di condrociti preesistenti che si dividono in cellule figlie e formano i gruppi isogeni, i quali producono nuova matrice extracellulare [2].

Per quanto riguarda la disposizione strutturale del tessuto cartilagineo, nella parte centrale i condrociti si organizzano in gruppi cellulari, mentre nella parte esterna le cellule assumono una forma appiattita e allungata.

## **1.2 Tipi di cartilagine**

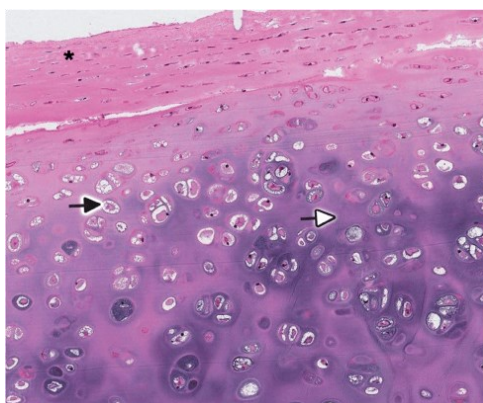
Per rispondere ai diversi requisiti meccanici locali, le cartilagini si differenziano per la composizione della matrice amorfa e per la quantità e il tipo delle fibre presenti [2]. In base a questi criteri si distinguono tre tipi di cartilagine: cartilagine ialina, cartilagine elastica e cartilagine fibrosa.

### 1.2.1 Cartilagine ialina

La cartilagine ialina è il tessuto cartilagineo più comune nel corpo. Appare con una colorazione bianco-bluastro: infatti il nome deriva dal suo aspetto vitreo e traslucido a causa della sottigliezza delle fibre di collagene [3]. Essa costituisce lo scheletro fetale temporaneo per poi essere gradualmente sostituita dall'osso; nell'adulto riveste le superfici ossee delle articolazioni mobili, forma le cartilagini costali, le quali connettono l'estremità di ogni costa allo sterno, ed è di sostegno alle vie respiratorie e al setto nasale. Inoltre, funge anche da cartilagine di congiunzione, formando il disco epifisario, interposto tra la diafisi e l'epifisi delle ossa lunghe in accrescimento [5].

Il 65% del suo peso totale è costituito da acqua, il 15% da collagene di tipo II, il 15% da proteoglicani e il 5% da condrociti [5]: si tratta quindi di un tessuto fortemente idrato. La sostanza intercellulare amorfa contiene una moderata quantità di fibrille di collagene, prevalentemente di tipo II, incluse in una sostanza fondamentale compatta, ricca di glicosamminoglicani; sono quasi assenti le fibre elastiche. Le fibre di collagene si dispongono seguendo le sollecitazioni di trazione e compressione, operando una divisione omogenea del carico meccanico. Al microscopio ottico le fibrille di collagene non si distinguono dalla sostanza amorfa perché le loro dimensioni sono submicroscopiche e hanno un indice di rifrazione molto simile a quello della sostanza amorfa in cui sono immerse [1].

Oltre agli aggregati di proteoglicani, che intrappolano molecole d'acqua, assume importanza la condronectina, una glicoproteina che promuove l'adesione dei condrociti al collagene [4]. La cartilagine ialina, ad eccezione di quella articolare, è ricoperta dal pericondrio, necessario per l'accrescimento della cartilagine sottostante e formato da collagene di tipo I e da molti condroblasti, che si differenziano facilmente in condrociti per mitosi [4] (Figura 1.1).

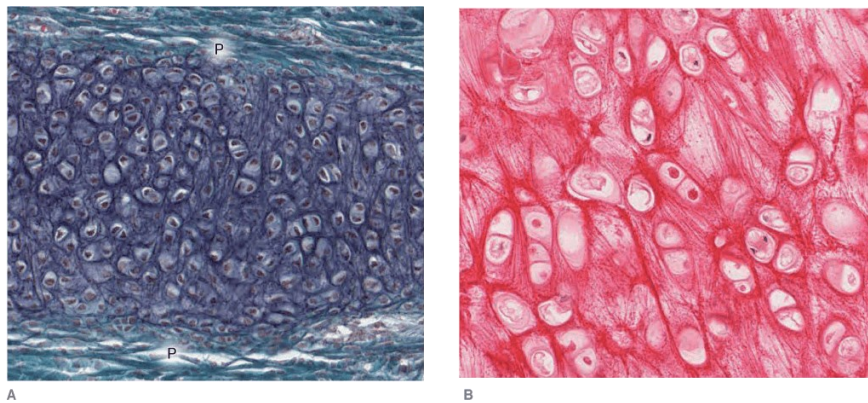


**Figura 1.1** Cartilagine ialina della trachea caratterizzata dalla presenza del pericondrio (asterisco), della matrice extracellulare (freccia bianca) e dei condrociti situati nelle lacune (freccia nera) [1].

L'istogenesi della cartilagine ialina inizia dalle cellule mesenchimali, che contraggono i prolungamenti protoplasmatici e si moltiplicano velocemente formando i condroblasti, che hanno un citoplasma ricco di ribosomi. Inizia quindi la sintesi e la deposizione della matrice che separa i condroblasti tra loro. Questo processo di differenziazione inizia al centro e si diffonde verso l'esterno. Pertanto, mentre le cellule periferiche sono ancora condroblasti, le cellule più centrali si presentano già come condrociti. Il tessuto mesenchimale della superficie diventa il pericondrio [4].

### 1.2.2 Cartilagine elastica

La cartilagine elastica ha la funzione di fornire un sostegno elastico e flessibile dovuto alla presenza di una fitta rete di fibre elastiche, che si diramano in tutte le direzioni [3]. Le fibre elastiche conferiscono a questo tipo di cartilagine un colore giallastro. Essa è stabilizzata anche dalle fibrille di collagene di tipo II, che sono mascherate da una matrice contenente proteoglicani. Inoltre è ricoperta dal pericondrio. Rispetto alla cartilagine ialina, oltre a un maggior contenuto di elastina, si differenzia per una minore quantità di proteoglicani e per il fatto che essa non si ossifica con l'età, essendo meno suscettibile ai processi degenerativi [2] [4]. Le lacune sono molto ravvicinate per la scarsità relativa di matrice [1] (Figura 1.2). Si trova nel padiglione auricolare, nelle pareti del condotto uditivo esterno, nelle tube di Eustachio, nell'epiglottide e nella laringe.



**Figura 1.2** Cartilagine elastica del padiglione auricolare (A) e dell'epiglottide (B), entrambe caratterizzate da lacune molto ravvicinate e contenenti quasi tutte un solo condrocita [1].

### 1.2.3 Cartilagine fibrosa

La cartilagine fibrosa o fibrocartilagine viene così definita perché i fasci spessi e fibrosi di collagene prevalgono sulla sostanza fondamentale. I condrociti hanno una forma appiattita e sono orientati a formare delle colonne, disposte parallelamente e separate da fibre di collagene, soprattutto di tipo I (Figura 1.3). Essendo questo tessuto sottoposto sia a forze di trazione che

di compressione, i fasci delle fibre di collagene seguono la direzione principale della sollecitazione in trazione [4]. La matrice extracellulare è meno abbondante in questo tipo di cartilagine. Una particolarità della fibrocartilagine è l'assenza del pericondrio, in quanto essa è un tessuto di transizione tra il tessuto connettivo denso e la cartilagine ialina, da cui trae nutrimento per diffusione [5]. È un tessuto caratterizzato da una notevole resistenza ed è presente nei dischi intervertebrali, nella sinfisi pubica, nei menischi articolari e nell'inserzione di alcuni tendini sull'osso.



**Figura 1.3** Cartilagine fibrosa del disco intervertebrale, composta da condrociti interposti a fibre di collagene [1]

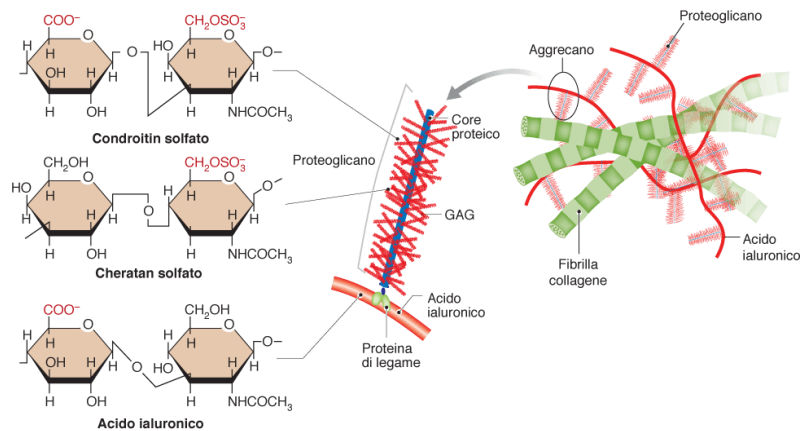
### **1.3 Cartilagine articolare**

#### *1.3.1 Anatomia e composizione strutturale*

Nelle superfici scheletriche delle articolazioni mobili (diartrosi), la cartilagine forma una superficie di scorrimento levigata e ammortizzante tra le estremità ossee [1]. Proprio perché riduce l'attrito e facilita il movimento delle ossa, essa prende il nome di cartilagine articolare. Essa, in un ginocchio adulto, ha uno spessore di 1,5-3 mm [6] e si struttura in base alle sollecitazioni meccaniche a cui è sottoposta al fine di ripartire il carico al meglio. È priva di pericondrio e di conseguenza viene alimentata attraverso la diffusione di ossigeno e sostanze nutritive grazie al liquido sinoviale. Nonostante questa caratteristica, ha una struttura interna tipica delle cartilagini ialine.

La matrice extracellulare contiene prevalentemente collagene di tipo II e la sostanza fondamentale è costituita dal 30-40% di proteoglicani, i quali usano proteine di legame per associarsi a lunghe molecole di acido ialuronico, formando aggregati proteoglicanici, detti aggregati, che hanno una lunghezza di 3-4  $\mu\text{m}$  [1] [4]. I GAGs, legati covalentemente al core proteico attraverso legami glicosidici, sono condroitin 4-solfato, condroitin 6-solfato e cheratan solfato; essendo le funzioni ossidriliche esterificate con gruppi solfato, diventano molecole cariche negativamente e quindi capaci di attirare l'acqua [1] [2] (Figura 1.4). Quest'elevata

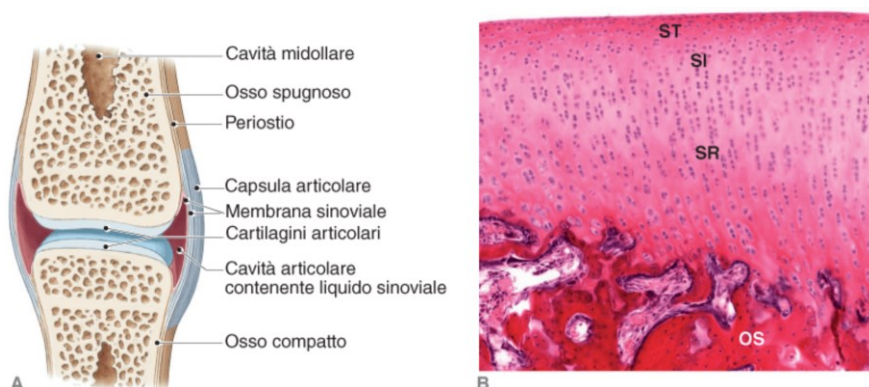
quantità di acqua di solvatazione legata alle cariche negative dei glicosamminoglicani conferisce alla matrice una consistenza resistente ed elastica, regola il grado di idratazione del tessuto per consentire scambi di fluidi e gas e funge da filtro molecolare [1].



**Figura 1.4** Composizione molecolare della matrice della cartilagine articolare caratterizzata da molecole di aggreganti e fibrille di collagene.

La matrice extracellulare contiene una grande varietà di collagene (tipi II, VI, IX, X, XI) che determinano le differenti proprietà meccaniche. Il collagene di tipo II costituisce la maggior parte (90%) delle fibrille.

Se l'acqua costituisce il 65-80% del volume cartilagineo, solo l'1-5% è associato ai condrociti [7]. Essi non contribuiscono alle caratteristiche meccaniche del tessuto in modo diretto, ma la loro disposizione è in relazione alla direzione delle sollecitazioni subite; nelle zone marginali i condrociti assumono forma ellittica e appiattita (strato tangenziale) mentre in quelle più centrali si presentano come cellule rotondegianti (strato intermedio), le quali ancora più in profondità si riuniscono in gruppi isogeni allungati e disposti in colonne parallele tra loro e perpendicolari all'osso spugnoso (strato radicale) (Figura 1.5).



**Figura 1.5** Rappresentazione schematica dell'articolazione tra due ossa lunghe (A) e sezione istologica di cartilagine articolare (B) caratterizzata da strato tangenziale (ST), strato intermedio (SI), strato radicale (SR) in prossimità dell'osso spugnoso (OS) [1].

I condrociti presentano sulla superficie anche delle ciglia che, assieme ai recettori meccanosensibili, permettono di percepire variazioni meccaniche locali [8]. Essendo la cartilagine un tessuto non vascolarizzato, essi respirano in bassa tensione di ossigeno. Metabolizzano perciò il glucosio principalmente per glicolisi anaerobica, in cui il prodotto finale è l'acido lattico [4]. La loro funzione dipende da un appropriato equilibrio ormonale: lo dimostrano studi che rivelano che la sintesi dei glicosamminoglicani solfati è accelerata dall'ormone della crescita, dalla tirossina e dal testosterone, invece è ritardata dal cortisone, dall'idrocortisone e dall'estradiolo[4].

Le proprietà fisiche della cartilagine articolare sono determinate dalla rete fibrillare di collagene, che fornisce la resistenza a trazione, e dagli aggregati intrappolati, che conferiscono la resistenza alla compressione [8]. La differente quantità e disposizione di collagene e aggregati e la distanza cellula-matrice determinano la distinzione di tre diverse regioni della matrice extracellulare. La sottile matrice pericellulare è caratterizzata dalla presenza di collagene di tipo VI e di tipo IX e altre proteine; essa permette l'interazione dei condrociti con l'ambiente extracellulare attraverso dei recettori di superficie, svolgendo il ruolo di mecano-trasduzione e contribuendo a mantenere attiva l'attività sintetica a basso turnover delle cellule [8]. La matrice territoriale presenta fibre di collagene poco organizzate e aggregati integri. Al contrario nella matrice interterritoriale, che è la più lontana dai condrociti, il collagene ha una disposizione ordinata e gli aggregati di proteoglicani sono degradati; infatti, in essa si concentrano i prodotti della degradazione incompleta degli aggregati [9]. Quest'ultimo aspetto fa risaltare il fatto che, mentre i condrociti maturi non esibiscono attività mitotica e mantengono un metabolismo quasi stazionario che stabilisce un equilibrio tra i processi anabolici e catabolici, i glicosamminoglicani vengono sostituiti più facilmente durante lo sviluppo [8].

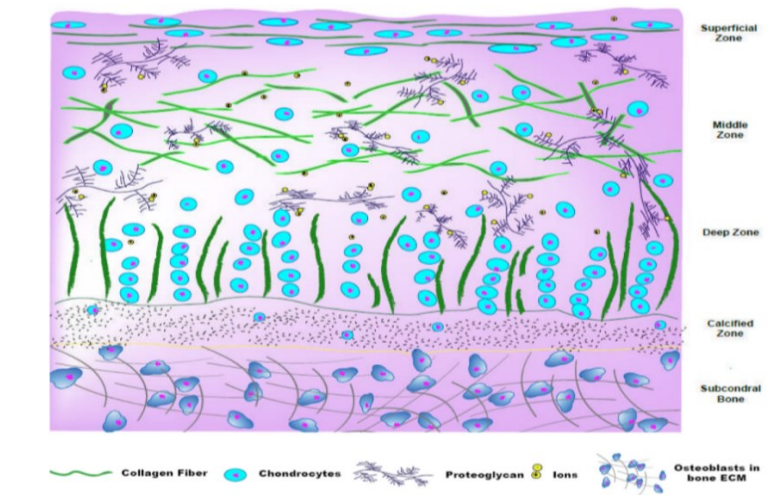
L'organizzazione strutturale della cartilagine articolare riflette il suo ruolo funzionale. Si divide in zona superficiale, zona intermedia, zona profonda e zona calcificata (Figura 1.6). La zona superficiale fornisce le più alte proprietà di resistenza a trazione, riuscendo a resistere alla forza di taglio e alla frizione: presenta infatti la più alta densità di collagene. In questa zona, che è bagnata dal liquido sinoviale, i condrociti sono appiattiti e allineati parallelamente alla superficie e le fibre di collagene sono sottili, anch'esse parallele tra loro. Il contenuto di aggregati è minimo. Qui si trova la lubrificazione, una proteina con un'importante funzione lubrificante. Tra i proteoglicani presenti ci sono la decorina e il biglicano, i quali hanno la funzione di ridurre il diametro delle fibre di collagene e contribuirne l'assemblaggio.

Più in profondità la zona intermedia è caratterizzata da cellule che assumono una forma più arrotondata e da fibre di collagene con un orientamento casuale.



Si trova poi la zona profonda. Qui la densità cellulare è molto bassa, invece il contenuto di aggregati è massimo. Il diametro delle fibrille di collagene è molto grande, sebbene il contenuto di collagene sia minimo. Uno strato detto “tidemark” separa questa zona da quella che si trova più profondità.

Infine è presente la zona calcificata, dove i pochi condrociti esprimono solo il fenotipo ipertrofico; questi condrociti sono le uniche cellule che sintetizzano collagene di tipo X, utile per la mineralizzazione della cartilagine. La sua struttura è particolarmente adatta a distribuire le forze meccaniche in condizioni di carico fisiologico, in cui solo una minima frazione del carico è attenuata dagli strati superiori [8]. A differenza di quanto avviene durante l’ossificazione, questa matrice non viene riassorbita completamente durante lo sviluppo. Essa rappresenta un’interfaccia di eccellente integrazione strutturale con l’osso subcondrale [9].



**Figura 1.6** Struttura della cartilagine articolare [6].

La cartilagine articolare si differenzia per accrescimento interstiziale; a causa della graduale erosione delle cellule e della matrice vicino alle superfici articolari, la cartilagine deve essere sostituita dall’interno, in quanto non esiste pericondrio che possa aggiungere cellule per apposizione [4].

La cartilagine delle articolazioni si rigenera con difficoltà e spesso in modo incompleto. Difatti questo tessuto ha la più bassa densità volumetrica cellulare rispetto ad ogni altro tessuto del corpo: il volume dei condrociti ammonta in media solo all’1-2% del volume totale della cartilagine nell’uomo adulto. Ciò contrasta con le cartilagini del feto e dei primi anni di vita, il cui volume cellulare è molto più elevato. Con il progredire dello sviluppo, si assiste a una diminuzione graduale del contenuto cellulare e della sintesi della matrice, raggiungendo il punto più basso quando l’individuo ha 20-30 anni [9]. Inoltre i condrociti maturi sono completamente incapsulati nella densa matrice extracellulare e non sono in grado di migrare e quindi di



proliferare in modo significativo, a differenza delle cellule dell'osso. La capacità rigenerativa della cartilagine risulta quindi molto limitata [6]. A questi motivi di scarsa rigenerazione delle cellule, risulta fondamentale aggiungere che, essendo la cartilagine articolare un tessuto che trae nutrimento solo dall'esterno, anche solo una variazione metabolica del liquido sinoviale può causare grandi danni all'articolazione.

### *1.3.2 Proprietà meccaniche e funzioni*

La cartilagine ha notevoli proprietà biomeccaniche. Questo tessuto si differenzia soprattutto per le proprietà viscoelastiche e lubrificanti. La cartilagine ha la capacità di resistere a deformazioni reversibili e per questo può essere considerata un materiale altamente viscoelastico. Questo comportamento è dovuto a due meccanismi: in primo luogo, alle forze di trascinamento del fluido interstiziale che si muove attraverso la matrice solida porosa e, in secondo luogo, alla viscoelasticità intrinseca della rete di fibre di collagene e proteoglicani. Per spiegare la prima causa si fa uso del modello bifasico, secondo cui la cartilagine è composta da una fase liquida e una fase solida: la fase fluida interstiziale, considerata con carattere non viscoso, si differenzia dalla fase solida della matrice porosa di collagene e proteoglicani, considerata omogenea, isotropa, permeabile e linearmente elastica. Dalle interazioni tra queste due fasi, che nascono in presenza di forze di carico, dipendono le proprietà viscoelastiche, associate al movimento del fluido attraverso gli interstizi della parte solida della matrice [6] [10].

La seconda causa è invece associata alla composizione interna della rete dei complessi di proteoglicani. I gruppi solfato e carbossilici dei GAGs, carichi negativamente, determinano una densità di carica negativa, chiamata con il termine inglese FCD ("fixed-charge density"). La cartilagine, però, come tutti i tessuti, deve rispettare la legge dell'elettro-neutralità. Per possedere quindi carica netta nulla, un elevato numero di ioni positivi (come  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$ ) deve essere presente nel liquido interstiziale. La concentrazione di ioni all'interno della cartilagine articolare risulta quindi maggiore rispetto al liquido sinoviale: questa causa una differenza di pressione osmotica che genera il potenziale di Donnan, che ha una direzione dalle zone a più bassa FCD a quelle a più alta FCD; la sua manifestazione si nota nel rigonfiamento della cartilagine, detto "swelling" [11]. Il comportamento a compressione genera un cambiamento di volume: durante la compressione, infatti, le molecole d'acqua si staccano dai GAGs e vengono cedute al liquido sinoviale. Questo cambiamento determina un aumento del FCD all'interno del tessuto, e quindi anche della pressione osmotica. Il flusso netto di fluidi, che trascina con sé gli ioni carichi distribuiti, genera un potenziale di diffusione in direzione opposta al flusso di fluidi, alterando l'equilibrio tra ioni positivi e negativi dell'ECM [11]. Quando l'acqua viene espulsa,

la cartilagine mostra comunque una certa resilienza, dimostrando che la rigidità effettiva del tessuto aumenta al diminuire del volume. La rigidità a compressione è influenzata dalle fibrille di collagene e dall'organizzazione strutturale dei glicosamminoglicani nei proteoglicani: essi, infatti, presentano un'elevata densità di cariche negative e, per minimizzare le forze repulsive tendono a respingersi, assumendo una conformazione estesa. Al termine della compressione, si verifica il ripristino delle dimensioni originali della cartilagine grazie al riassorbimento dell'acqua che, essendo attratta dalle cariche negative, va ad occupare gli spazi vuoti tra le ramificazioni dei GAGs [8]. Questo meccanismo è alla base di qualsiasi movimento articolare ed è fondamentale per garantire scambi di gas e nutrienti tra liquido sinoviale e cartilagine articolare [8].

I parametri che caratterizzano un processo di compressione della cartilagine sono il modulo di aggregazione ( $H_A$ ), cioè la rigidità del tessuto all'equilibrio, in media pari a circa 0,563 MPa [12], con una variabilità che può andare da 0,1 a 2 MPa [6], e la permeabilità ( $k$ ), ovvero la resistenza che un fluido incontra nel fluire all'interno della matrice, il cui ordine di grandezza è  $10^{-15} \text{ m}^4/\text{Ns}$ ; essendo strettamente legato al contenuto acquoso,  $k$  è maggiore all'interfaccia tra superficie cartilaginea e articolazione, diminuendo poi all'aumentare della profondità. La velocità media dello scorrimento del fluido è definita come il prodotto fra il coefficiente di permeabilità e il gradiente di pressione.

Per spiegare gli aspetti tipici del rigonfiamento e della deformazione di questo tessuto si è anche sviluppata la teoria basata su un modello trifasico; la cartilagine viene perciò identificata da tre fasi incompressibili: una fase solida di collagene e proteoglicani della matrice extracellulare, una fase liquida associata all'acqua interstiziale, e una fase associata agli ioni  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ . Da questo modello teorico si sono quindi derivate le equazioni costitutive, imponendo l'elettroneutralità e la condizione di conservazione della quantità di moto [10].

Si evince che l'elasticità è una proprietà meccanica molto importante per questo tessuto. Si è perciò interessati ad analizzare il suo modulo di elasticità, che dipende dalla densità e dall'orientamento delle fibre di collagene. Quando la cartilagine è sottoposta a una prova di trazione, le fibre di collagene si allineano lungo la direzione di carico. È stato studiato il modulo elastico in trazione di cartilagini articolari umane del ginocchio e si è scoperto che il valore del modulo era più alto nella zona superficiale (10,1 MPa) rispetto alle zone più centrali (5,4 MPa). Questo può essere attribuito al fatto che il collagene è più abbondante e organizzato nella zona superficiale. Nello stesso studio, è stato anche dimostrato che le aree sottoposte ad un alto carico di peso hanno valori di modulo di trazione più bassi rispetto alle aree a basso carico [6].

La qualità di lubrificazione della cartilagine è così elevata che non esiste materiale artificiale in grado di produrre fedelmente questa proprietà. Essa viene descritta dal coefficiente di frizione, che rappresenta l'attrito o la resistenza allo scorrimento tra due superfici divise da una forza normale. La frizione è alta quando il fluido viene espulso, è più bassa quando la cartilagine presenta una normale quantità di fluido [10]. In generale la cartilagine costituisce una superficie articolare unica con un coefficiente di frizione molto basso (0,008), una proprietà derivante dalla presenza dello strato limite di lubrificanti come la lubrificina e l'acido ialuronico [6].

Tutte queste caratteristiche biomeccaniche dimostrano come la cartilagine articolare svolga un ruolo unico nel dissipare ripetutamente i carichi di compressione, nel ridistribuire le forze di carico e nell'attenuare gli attriti articolari [6].

## **CAPITOLO 2    Le cause della degenerazione cartilaginea e i trattamenti chirurgici in uso**

La cartilagine è uno tra i principali tessuti connettivi nel corpo umano, ma la sua struttura non vascolarizzata la rende un tessuto con limitata capacità di autorigenerazione. Per questo i difetti cartilaginei, derivanti da danni traumatici o da malattie degenerative, rappresentano un grave problema per la salute, in quanto la progressiva perdita di tessuto cartilagineo provoca l'usura delle articolazioni, esponendo ulteriormente le estremità ossee e lasciandole senza protezione [6]: in questo modo la cartilagine perde le sue principali funzioni di sostegno e lubrificazione. Infatti, a causa della limitata capacità di guarigione intrinseca, una semplice lesione cartilaginea può portare a difetti irreparabili che causano infiammazioni delle articolazioni e comportano dolore, rigidità dell'articolazione e difficoltà di movimento.

I difetti cartilaginei possono essere causati da un'erosione graduale, come è caratteristico di molte forme di artrite, quali l'osteoartrite e l'artrite reumatoide, o da fratture [13]. Fattori di rischio come l'obesità e la predisposizione genetica aumentano la probabilità di incorrere in una progressiva degenerazione della cartilagine articolare [14].

### **2.1 Patologie**

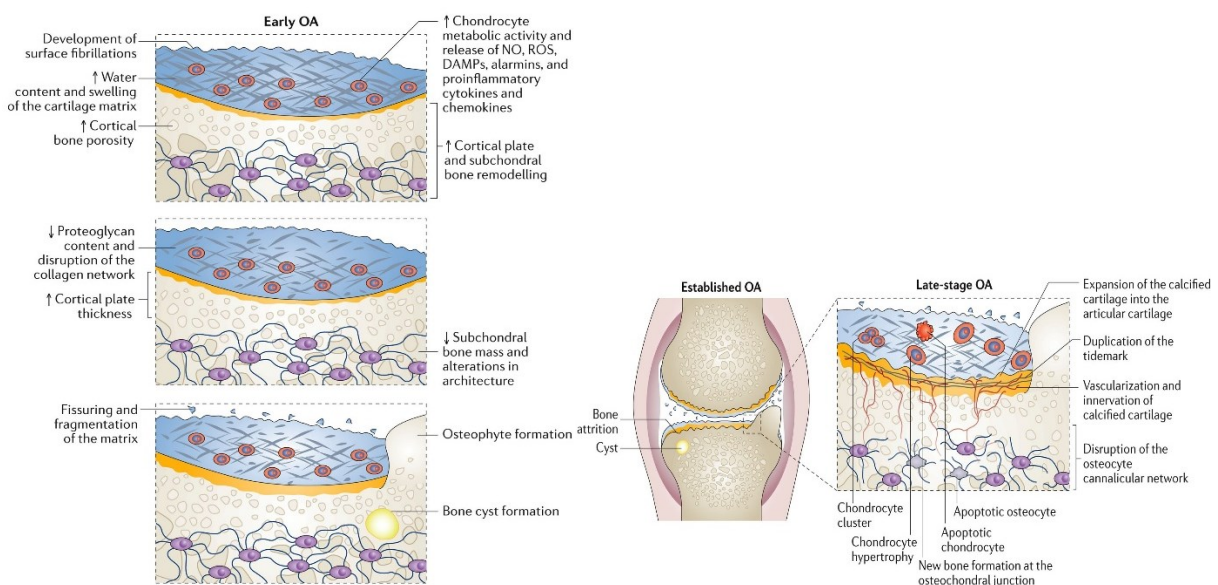
#### *2.1.1 Osteoartrite*

L'osteoartrite è una malattia articolare degenerativa che colpisce il 50% delle persone che hanno superato i 60 anni e, nelle zone sottoposte a maggior carico, provoca una graduale degenerazione della cartilagine e delle regioni ossee del tessuto osteocondrale.

Nelle articolazioni diartrodiali, la cartilagine articolare, la cartilagine calcificata e l'osso corticale e trabecolare subcondrale formano l'unità osteocondrale, che si adatta in modo unico al trasferimento del carico. Durante il processo degenerativo la composizione, le proprietà funzionali e le strutture di questi tessuti subiscono evidenti alterazioni [8].

Uno dei primi cambiamenti è il rigonfiamento della matrice, dovuto all'aumento del contenuto di acqua e associato alla perdita di glicosamminoglicani. I condrociti durante la malattia secernono enzimi degradativi, che non solo interrompono l'integrità della matrice cartilaginea, ma portano anche alla generazione di prodotti di degradazione e alla secrezione di composti molecolari associati al danno (DAMP, damage-associated molecular patterns), di specie reattive dell'ossigeno e di citochine proinfiammatorie, tutti fattori che contribuiscono a un'ulteriore deregolazione della funzione dei condrociti e che determinano la denaturazione del collagene e dei GAGs. La degradazione della matrice avviene inizialmente nella zona superficiale della

cartilagine per poi diffondere nelle regioni più profonde. Nell'osso subcondrale si verifica un rimodellamento della placca corticale, portando a un aumento della porosità. Con il progredire dell'artrosi, diminuisce il contenuto di proteoglicani, aumenta l'erosione della rete di collagene e le interazioni tra le proteine si indeboliscono, diventando suscettibili alla rottura. Macroscopicamente, i cambiamenti della composizione della matrice sono accompagnati dalla comparsa di lesioni superficiali e crepe microscopiche che, con l'avanzare della malattia, portano al deterioramento della cartilagine e alla formazione di fessure che si estendono negli strati più profondi della cartilagine, provocando l'esposizione delle zone sottostanti di cartilagine calcificata e osso subcondrale. Nello stadio avanzato dell'osteoartrite, i condrociti si organizzano principalmente in raggruppamenti, ma è evidente anche la loro apoptosi: nelle zone più profonde, essi subiscono alterazioni fenotipiche, sviluppando caratteristiche di ipertrofia. L'ispessimento della zona calcificata e del "tidemark" determina un assottigliamento della cartilagine articolare superficiale tanto che la cartilagine calcificata si espande e avanza nella sovrastante cartilagine articolare ialina, formando osteofiti. Questo processo è avviato dalla penetrazione di elementi vascolari e nervosi che li accompagnano nella giunzione osteocondrale. Oltre allo sviluppo di osteofiti ai margini articolari e cisti all'interno dell'osso più profondo, la placca corticale subcondrale si deforma e si appiattisce, determinando l'attrito osseo (Figura 2.1) [8].



**Figura 2.1** Cambiamenti dell'unità osteocondrale del ginocchio durante l'osteoartrosi (AO) [8].

Diversi fattori influenzano lo sviluppo e il progressivo avanzamento dell'osteoartrite. Tra di essi quelli che predispongono maggiormente alla malattia sono l'ereditarietà, l'obesità, il sesso femminile, i traumi articolari e lo stress continuo. L'infiammazione inoltre svolge un ruolo

determinante sia per la capacità di causare la malattia sia per determinarne il suo sviluppo: infatti, la minore quantità di proteoglicani e di collagene comporta l'indebolimento e l'inefficienza dei condrociti, che diventano gradualmente necrotici. Tra le cause si riporta anche l'invecchiamento, che però svolge un ruolo subalterno e non è la causa principale della malattia: si è dimostrato che, sul piano biochimico, non è sempre possibile definire un legame tra l'evento della malattia e l'avanzare dell'età. Nonostante ciò, è noto che la vecchiaia determina nella cartilagine una perdita di elasticità e di resistenza alle sollecitazioni meccaniche, esponendo il tessuto a un maggior rischio di osteoartrite [15][16].

Questa malattia si manifesta con sintomi difficilmente diagnosticabili nelle fasi iniziali, ma che si intensificano rapidamente nel tempo [17]. La principale manifestazione è associata al dolore: esso è strettamente collegato al movimento in quanto diminuisce e si calma a riposo. Altri sintomi e segni clinici sono il gonfiore, la deformità articolare, la rigidità e il difficile movimento delle articolazioni, che a volte determina il caratteristico crepitio. L'aumento del volume dell'articolazione è associato a un gonfiore locale, causato dall'irregolarità delle superfici articolari, tra loro ravvicinate e poco lubrificate [15].

Considerando che questa malattia ha un impatto notevole sulla mobilità delle persone, è importante trattare i difetti cartilaginei fin da subito, per evitare che i danni progrediscono portando all'artrosi [18]. Nella maggior parte dei pazienti affetti da osteoartrite uno stile di vita basato su una dieta equilibrata e su attività fisica moderata permette un aumento della funzionalità articolare e una riduzione del dolore. Tuttavia, a volte questo non è sufficiente. Le attuali terapie mediche si concentrano sull'assunzione di farmaci antinfiammatori o antidolorifici, che alleviano solo i sintomi, ma non rimuovono le cause della malattia [19]. Nei casi più gravi si ricorre ad interventi chirurgici.

### *2.1.2 Artrite reumatoide*

L'artrite reumatoide è una malattia infiammatoria cronica che si manifesta soprattutto nelle articolazioni sinoviali. Provoca deformazione e dolore articolare con conseguente riduzione della funzionalità articolare. Si differenzia dall'osteoartrite perché inizialmente colpisce la membrana sinoviale, anziché la cartilagine. L'esordio della malattia è più frequente durante la mezza età, tra i 40 e i 60 anni, e le donne sono più soggette rispetto agli uomini con un rapporto di 3 a 1. In generale ha un'incidenza dell'1-2% nella popolazione [20].

Sebbene la causa dell'artrite reumatoide non sia chiara, si ritiene che sia associata a una combinazione di fattori genetici e ambientali. In particolare, si è notato che la malattia si sviluppa quando in una persona geneticamente predisposta agisce un antigene scatenante,

determinando un processo infiammatorio che ha carattere erosivo. La risposta infiammatoria comporta l'eccesso di liquido sinoviale e lo sviluppo di tessuto fibroso [15]. L'infiammazione colpisce infine anche l'osso sottostante e la cartilagine, che si assottiglia e si degrada progressivamente, portando a deformabilità articolare e compromettendo la mobilità. Per questo i sintomi sono rappresentati da superfici articolari calde, gonfie, dolorose e rigide, in particolare a seguito di una prolungata inattività come per esempio il riposo notturno. A differenza dell'osteoartrite, dove il riposo è utile per alleviare il dolore, in questo caso, in seguito ad ore di sonno e immobilità, si manifesta l'aumento della rigidità, che può durare anche più di un'ora dopo il risveglio; solo dei minimi e delicati movimenti riescono ad alleviare i sintomi. L'infiammazione e la rigidità dopo un lungo riposo sono le caratteristiche di questa malattia, utili per distinguerla dalle malattie non infiammatorie, come l'artrite [20].

Anche in questo caso il trattamento può comprendere sia minime variazioni sullo stile di vita sia la prescrizione di farmaci al fine di controllare l'infiammazione e prevenire il danno articolare. Per questo per ridurre il dolore può essere d'aiuto un bilanciato equilibrio tra esercizio e riposo, accompagnati dalla somministrazione di antidolorifici e antinfiammatori.

## **2.2 Eventi traumatici**

I danni cartilaginei possono anche essere causati da un evento improvviso. Un impatto brusco e potente sulla superficie articolare o un carico ripetuto provocano microdanni ai condrociti, portando alla degenerazione e poi alla morte cellulare: in base all'intensità e alla gravità del trauma si generano micro-lacerazioni del tessuto cartilagineo, e talvolta dell'osso. Può anche succedere che la superficie esterna risulti essere intatta e presenti invece una consistenza più molle nella parte interna del difetto [7]. Le lesioni della cartilagine del ginocchio sono molto frequenti anche negli atleti e sono soprattutto riferite a infortuni in sport di contatto come basket, calcio o rugby. In questi casi l'età non è un fattore di rischio, ma può portare ad una precoce degenerazione e rottura delle lesioni, esponendo maggiormente il paziente all'artrosi, anche in giovane età. Viene perciò usato il termine di "artrosi traumatica" per indicare la malattia degenerativa che inizia ad alterare il tessuto cartilagineo solo in seguito ad un infortunio: questo tipo di artrosi può manifestarsi anche dopo molti anni dalla frattura, dalla lacerazione di un legamento o da lesioni del menisco. Determinante è perciò la sede della lesione e la sua dimensione per trovare in modo veloce e mirato una soluzione efficace.

### **2.3 Riparazione della cartilagine**

La cartilagine articolare ha una risposta limitata al danno nell'adulto principalmente a causa della mancanza di vascolarizzazione, che inibisce la comparsa di cellule infiammatorie e di riparazione, e a causa della presenza di una densa matrice extracellulare ricca di proteoglicani, la quale incorpora i condrociti impedendo la loro migrazione [13].

Le lesioni cartilaginee possono dare origine a due tipi di difetti: difetti a spessore parziale e a spessore totale, detti anche osteocondrali.

I difetti condrali a spessore parziale colpiscono solo la cartilagine articolare e non si estendono all'osso subcondrale sottostante; subito dopo la creazione di un difetto a spessore parziale si verificano alcune attività metaboliche ed enzimatiche e i condrociti possono iniziare a proliferare e a sintetizzare l'ECM. Nonostante ciò, non c'è un numero sufficiente di nuovi condrociti che migrano nei siti lesi per riparare efficacemente la lesione e la loro attività riparativa in genere cessa prima che il difetto cartilagineo sia guarito, determinando così un difetto duraturo che riduce la funzione del tessuto e può fungere da punto di partenza per la degenerazione del tessuto stesso: non si verifica quindi una completa autoriparazione.

Le lesioni osteocondrali, invece, coinvolgono tutto lo spessore della cartilagine fino all'osso subcondrale; in questo caso, le cellule del sangue e le cellule progenitrici mesenchimali hanno accesso alla cartilagine danneggiata dall'osso subcondrale e si instaura il processo di guarigione costituito da infiammazione, proliferazione e rimodellamento cicatriziale; tuttavia, si è dimostrato che questo tessuto di riparazione è fibrocartilagineo e presenta caratteristiche meccaniche inferiori e una maggiore permeabilità rispetto alla cartilagine ialina. Di conseguenza, il processo di riparazione spontanea nei difetti a tutto spessore è solo transitorio e imperfetto; la degenerazione del tessuto si verifica nei mesi successivi e procede in modo continuo. In questi casi, si verifica spesso l'ipertrofia del tessuto cartilagineo, il quale viene infine sostituito dalla progressiva deposizione di osso subcondrale, determinando il contatto tra articolazioni: questo causa sia infiammazioni sia deformità articolari e il conseguente dolore riduce di molto la qualità di vita delle persone che ne sono affette [6], [21].

In conclusione, la risposta naturale alla riparazione nella cartilagine articolare adulta è quasi assente nelle lesioni a spessore parziale, mentre è presente in quelle a tutto spessore, dove però si dimostra essere meccanicamente inefficace perché incapace di sopportare i carichi locali [13]. La risposta alla riparazione della lesione è influenzata da molti fattori, come la profondità e la dimensione del difetto, l'età del paziente, l'entità del trauma meccanico o della malattia e il mal allineamento dell'articolazione [7].



Vista la scarsa capacità rigenerativa della cartilagine, in generale, in base alle condizioni del danno, prima si adottano procedure non chirurgiche, considerando sia trattamenti non farmacologici, come la terapia fisica, sia trattamenti farmacologici [22]. In assenza di infiammazione, la degenerazione della cartilagine può essere attenuata da infiltrazioni di acido ialuronico, il principale costituente del liquido sinoviale: questi trattamenti sono considerati di tipo conservativo, atti ad allontanare nel tempo i progressivi danni che le microlesioni possono generare [23]. I trattamenti farmacologici includono antinfiammatori e antidolorifici, bifosfonati, modulatori selettivi del recettore degli estrogeni [24] [25]; questi costituiscono però una terapia sintomatica e di conseguenza non hanno lo scopo di fermare l'ulteriore degenerazione della cartilagine, ma solo di alleviare il dolore [22].

## **2.4 Interventi chirurgici**

Una volta che la degenerazione del tessuto cartilagineo raggiunge un livello non più trattabile con le terapie sopra citate, le lesioni vengono curate chirurgicamente. Gli approcci clinici al trattamento delle lesioni della cartilagine articolare vanno dalla cura conservativa, volta a ridurre il disagio e preservare la mobilità, fino alla sostituzione chirurgica del tessuto danneggiato [16]. La scelta per l'intervento più adatto viene fatta valutando diversi fattori come l'età e le esigenze del paziente, l'attività motoria, l'eziologia delle lesioni, la grandezza e la profondità del danno [21]. Viene infatti applicata una distinzione per il trattamento delle lesioni osteocondrali in base al fatto se superano o meno i 2,5 cm<sup>2</sup>.

Di seguito viene riportata una descrizione dei trattamenti chirurgici oggi in uso (Figura 2.2).

### *2.4.1 Terapie chirurgiche*

#### *Debridement*

La tecnica del *debridement*, detta anche sbrigliamento, elimina i detriti dalla superficie articolare e leviga la lesione per alleviare il dolore [21]. Risulta essere “un lavaggio e una pulizia” articolare dai frammenti infiammatori presenti: lo scopo è quello di eliminare la cartilagine danneggiata affinché le articolazioni possano scorrere su una superficie sana. Questa tecnica di solito offre buoni risultati a breve termine. È preliminare per la tecnica di stimolazione del midollo osseo, come la perforazione o la microfrattura.

#### *Perforazione*

Poiché la cartilagine articolare non è irrorata da vasi sanguigni, l'idea di base di questo metodo è quello di favorire la migrazione delle cellule del sangue nei siti danneggiati per riparare il

tessuto. La perforazione nell'osso subcondrale interrompe la continuità dei vasi sanguigni e questo porta alla formazione di un coagulo sulla superficie, che avvia la classica cascata di guarigione delle ferite [13]. Se il difetto è protetto dal carico meccanico in questa fase, allora le cellule staminali mesenchimali del midollo osseo migrano nel coagulo per proliferare e differenziarsi nelle cellule del tessuto, assomigliando morfologicamente ai condrociti [7]. Essi producono però un tessuto fibrocartilagineo, che non ha proprietà meccaniche adatte a sopportare carichi a cui è sottoposta normalmente la cartilagine articolare [22].

### *Microfrattura (MF)*

Anche la tecnica della microfrattura, indicata con MF (Microfracture), consente la stimolazione del midollo osseo. Essa è tra i metodi più antichi e ancora più comunemente usati per stimolare la rigenerazione della neo-cartilagine in modo veloce. È adatta per piccoli difetti (< 2,5 cm<sup>2</sup>). Costituisce un miglioramento della tecnica precedente, in quanto le grandi lacune sono sostituite da piccoli fori, ma il principio di rigenerazione è lo stesso. Dopo che tutta la cartilagine danneggiata è stata rimossa, si crea un difetto stabile circondato da cartilagine normale, con un'esposizione completa della piastra subcondrale: vengono creati dei contorni stabili perpendicolari di cartilagine sana attorno al difetto e la placca ossea subcondrale viene poi perforata per formare microfratture distanti tra loro 3-4 mm, le quali facilitano il contatto con gli elementi del midollo osseo [16]. Il difetto viene riempito con il cosiddetto "super coagulo", un ambiente ottimale per le cellule pluripotenti del midollo per differenziarsi in cellule di un tessuto di riparazione stabile. Il successo della terapia dipende anche dalle fasi di riabilitazione successive all'intervento: prima è prevista la mobilizzazione con flessione ed estensione passiva del ginocchio, associata all'applicazione di un macchinario, detto CPM, che permette un movimento passivo continuo e infine la fase di carico, con un'attenzione alla protezione dal sovraccarico. Sebbene questo metodo sia tecnicamente semplice e poco invasivo, la superficie neo-cartilaginea formata risulta di qualità biomeccanicamente inferiore e meno durevole rispetto alla cartilagine ialina [7]. Si è osservato un tasso di successo più elevato rispetto alla perforazione a causa della mancanza di necrosi indotta dal calore e della minore destabilizzazione biomeccanica della placca ossea subcondrale [13].

### *Autotrapianto osteocondrale (OAT) o Mosaicplasty*

La tecnica del *mosaicplasty* consiste nel porre degli innesti osteocondrali autologhi nella regione del difetto. Vengono infatti trasferiti dei cilindri di cartilagine ialina matura del paziente stesso da una regione periferica sana e "inutilizzata" alla regione altamente sottoposta a carichi

meccanici contenente la lesione [13], [16]. La procedura, indicata con OAT (Osteochondral autologous transplantation), consiste nel prelevare dei campioni cilindrici di tessuto osteocondrale da aree soggette a bassi carichi, solitamente dalla periferia dei condili femorali, nel preparare e pulire la zona del difetto e nel porre questi “tappi” per creare un modello a “mosaico”, da cui il nome. Per la completa copertura del difetto vengono prelevate diverse misure dei tasselli. Questa tecnica offre il vantaggio della creazione di una superficie di sostegno in tempi abbastanza rapidi [7].

#### *Allotrapianto osteocondrale (OCA)*

L'allotrapianto osteocondrale, indicato con OCA (Osteochondral allograft transplantation), utilizza innesti cartilaginei delle banche di tessuti. Questa tecnica ha molti vantaggi, tra cui quello di riparare grandi difetti ( $> 2,5 \text{ cm}^2$ ), di utilizzare innesti di cartilagine matura, di ricoprire in modo completo il difetto senza lasciare zone scoperte che altererebbero la stabilità dell'impianto.

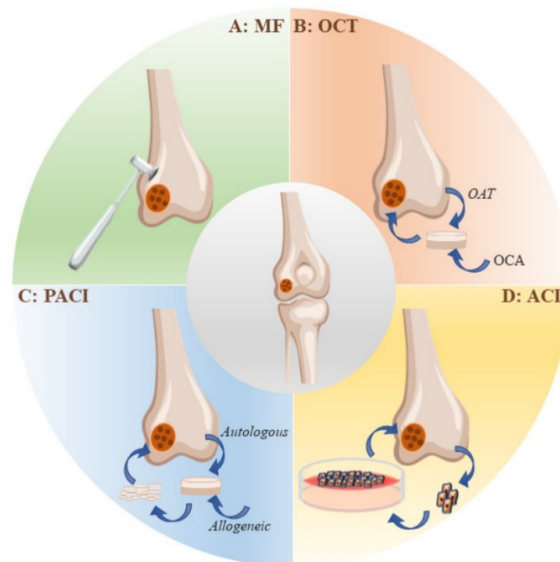
#### *Impianto particellare di cartilagine articolare (PACI)*

Nella tecnica di impianto di cartilagine articolare particellare la cartilagine articolare viene frantumata in particelle di dimensioni di 1-2 mm e impiantata nei difetti. Il metodo PACI (Particulate articular cartilage implantation) si divide in PACI autologo e PACI allogenico, a seconda della fonte degli innesti. Si è notato che il tessuto riparato è per lo più una miscela di cartilagine ialina e fibrocartilagine [16].

#### *Impianto autologo di condrociti (ACI)*

La tecnica ACI (Autologous chondrocyte implantation) è utilizzata per riparare lesioni grandi e profonde (fino a  $10 \text{ cm}^2$ ). Si divide in due fasi: in un primo intervento chirurgico viene eseguita una biopsia della cartilagine sana da un sito non portante della cartilagine e, successivamente, in un secondo intervento chirurgico, i condrociti autologhi, espansi in coltura, vengono impiantati nel difetto della cartilagine [16][18][21]. Attualmente il prodotto ACI approvato per l'uso clinico è costituito da aggregati sferici (detti sferoidi) di condrociti autologhi associati alla matrice autosintetizzata [18]. In particolare, è stata sviluppata una terapia clinica, denominata impianto autologo di condrociti indotto da matrice (MACI), in cui i condrociti vengono espansi in una membrana di collagene e poi reimpiantati nei difetti della cartilagine articolare [6]. Così si riduce al minimo la morbilità del sito donatore associata al prelievo del periostio e si previene la dedifferenziazione cellulare [21]. Il vantaggio di questa tecnica è

rappresentato dal fatto che è totalmente autologa. Inoltre, gli sferoidi sono autoadesivi all'osso subcondrale e quindi l'impianto non richiede punti di sutura, membrane, coperture o colla. Di conseguenza gli sferoidi vengono impiantati con minima invasività mediante artroscopia [18]. Un altro aspetto importante è che il prodotto della formazione di nuova cartilagine è prevalentemente di carattere ialino [6]: questo presuppone una migliore funzionalità a lungo termine, stimata fino a 11 anni [7].



**Figura 2.2** Attuali trattamenti chirurgici per la riparazione della cartilagine: (A) Microfrattura (MF), (B) Trapianto osteocondrale (OCT) di tipo autologo (OAT) e di tipo allogenico (OCA), (C) Impianto particellare di cartilagine articolare (PACI), (D) Impianto autologo di condrociti (ACI) [16].

#### 2.4.2 Limiti delle tecniche chirurgiche attuali

Sebbene questi metodi abbiano diversi gradi di successo, essi hanno mostrato benefici nel ridurre i sintomi solo a breve termine (da mesi a pochi anni) e nessuno di essi è in grado di dimostrare una costante riparazione della lesione articolare anche dopo i primi anni. Mancano inoltre studi scientifici rigorosi che dimostrino l'efficacia di questi trattamenti per indicazioni particolari. Pertanto, la scelta del trattamento per le lesioni della cartilagine dipende in gran parte dalla formazione e dall'esperienza professionale del chirurgo [13]. Queste tecniche, inoltre, risultano essere spesso anche costose e complesse [26].

L'aspetto critico delle tecniche per la stimolazione del midollo osseo, come la perforazione e la microfrattura, è la formazione di fibrocartilagine nella zona danneggiata; infatti, il sollievo dai sintomi è solo temporaneo e gli effetti terapeutici, inizialmente dimostrati, tendono a ridursi nel tempo a causa della non adeguata natura biomeccanica della fibrocartilagine e dei tessuti cicatriziali generati [27]. In aggiunta, per il successo della pratica chirurgica, sarebbe necessario che il coagulo di sangue fosse stabile e che ricoprisse la zona danneggiata in modo omogeneo.

Alcuni problemi associati alla formazione di un coagulo di sangue “di buona qualità” sono la natura incontrollata del sanguinamento proveniente dall'osso, la contrazione del coagulo mediata dalle piastrine che si verifica entro pochi minuti dalla sua formazione, riducendo la dimensione del coagulo e determinando il suo distacco dalla cartilagine circostante, la diluizione del sangue con liquido sinoviale e l'attività fibrinolitica o di dissoluzione del coagulo operata dal liquido sinoviale [13].

Nel *mosaicplasty* i tessuti cilindrici sono raccolti dalla cartilagine sana dello stesso paziente, ma la morbilità del sito donatore e la mancanza di integrità sono tra le cause dello scarso successo della pratica [22]. Gli spazi vuoti lasciati tra i tappi di innesto e il sito ricevente determinano instabilità e per questo motivo spesso le lacune vengono riempite di fibrocartilagine: si raccomanda quindi di non usare questa tecnica per difetti con una superficie superiore ai 4 cm<sup>2</sup> [7]. Problemi possono derivare anche dalle differenze tra il sito donatore e il sito danneggiato dal punto di vista dell'orientazione, della profondità e delle proprietà meccaniche dei tasselli di cartilagine. In generale, il trapianto di tessuto autologo è severamente limitato dalla scarsa disponibilità di cartilagine autologa e dalla difficoltà di modellare la delicata struttura tridimensionale necessaria per una buona riuscita dell'innesto [2].

Se per i metodi autologhi il problema è rappresentato dal trasferimento da un sito ad un altro dello stesso tessuto, negli allotrapianti si aggiungono le problematiche relative alla limitata disponibilità del tessuto donatore da innesto, il rischio di infezione, la scarsa integrazione e la perdita di resistenza meccanica [16].

Il limite principale dell'impianto autologo di condrociti è la necessità di compiere due interventi chirurgici associati a un processo di lavorazione in laboratorio. Si riscontrano però altri svantaggi come la distribuzione spaziale non uniforme dei condrociti, la mancanza di stabilità meccanica iniziale, la possibile ipertrofia a cui possono andare incontro i condrociti e la limitata disponibilità di condrociti all'aumentare dell'età [16]. Per esempio, soprattutto nel caso di lesioni dovute all'osteoartrite, questa tecnica non si è rilevata utile alla guarigione perché è necessario che l'impianto sia circondato da un ambiente favorevole alla formazione di nuovo tessuto e non in via di degradazione. Inoltre, l'elevato costo e il complicato processo di lavorazione sono le cause che limitano l'utilizzo dell'ACI.

Nei casi più gravi le implicazioni dovute a questi metodi causano il necessario intervento di sostituzione totale dell'articolazione, comportando allo stesso modo il rischio di complicazioni. Gli svantaggi descritti dimostrano come nessuno dei metodi clinici convenzionali finora adottati sia stato valutato in modo sufficientemente soddisfacente.

Allo stesso tempo, però, tutti questi aspetti mostrano quanto la chirurgia si sia spesa per trovare possibili rimedi per risolvere il problema della degenerazione cartilaginea, ma la serie di complicanze che ne derivano hanno limitato l'utilizzo di queste tecniche. In questo contesto, i metodi chirurgici oggi sembrano più orientati alla "riparazione", termine usato per indicare il ripristino della normale funzione della cartilagine, indipendentemente dalla composizione del nuovo tessuto che riempie i siti del difetto; fondamentale risulta, invece, la "rigenerazione", con cui si intende un processo che non solo ripristina le normali funzioni della cartilagine articolare lesionata, ma determina anche la formazione di nuovo tessuto indistinguibile dalla cartilagine nativa [6].

## **2.5 Ingegneria tissutale: una metodologia innovativa**

Una strategia alternativa alle tecniche chirurgiche è rappresentata da una nuova disciplina: l'ingegneria tissutale, che rappresenta un promettente approccio multidisciplinare per la riparazione e la rigenerazione dei tessuti [21]. In questo senso il termine "ingegneria tissutale" può associarsi a quello di "medicina rigenerativa". Allo scopo di trattare le lesioni della cartilagine, il nuovo approccio utilizza una combinazione di cellule e supporti cellulari per creare un tessuto ingegnerizzato. Fondamentale risulta il corretto uso dei biomateriali per la creazione di matrici su cui seminare cellule autologhe al fine di facilitare la crescita del tessuto. In base al tipo di applicazione clinica, è possibile progettare i biomateriali in modo da imitare al meglio la matrice extracellulare del tessuto nativo [28]. I supporti possono supportare la crescita cellulare e la produzione di nuova ECM e, nel frattempo, degradarsi per consentire la formazione del tessuto biologico desiderato.

Per quanto concerne gli obiettivi della presente tesi, lo scopo principale della Tissue Engineering è quello di riprodurre le proprietà meccaniche della cartilagine ialina *in vitro* e, allo stesso tempo, di fornire al supporto proprietà lubrificanti adeguate e di lasciare che esso si degradi nel tempo senza alterare tali proprietà [14].

La cartilagine è stata uno dei tessuti che per primi si sono studiati nell'ingegneria tissutale in ragione della sua apparente semplicità; tuttavia la particolare struttura e composizione del tessuto cartilagineo sono difficili da riprodurre in laboratorio. L'idea di base è molto simile a quella proposta dalle tecniche di stimolazione del midollo osseo: l'impalcatura di fibrina del coagulo di sangue potrebbe essere sostituita con un'impalcatura prefabbricata, mentre i fattori mitogenici e chemiotattici naturali nel coagulo di sangue potrebbero essere sostituiti con quantità controllate di cellule [13]. La tecnica MACI rappresenta la prima sperimentazione di ingegneria tissutale nell'ambito della cartilagine. Il limitato numero di condrociti disponibili e

la mancata integrazione dell'impianto in alcune situazioni dimostrano però la necessità di applicare miglioramenti, prendendo in considerazione anche nuovi materiali e studiando i loro effetti associati alle cellule impiantabili e la loro risposta nel sito ricevente.

Il motivo principale per cui si pone grande attenzione alle nuove tecniche dell'ingegneria tissutale per la riparazione della cartilagine danneggiata si basa sulla sua incapacità di autoriparazione. La scelta della combinazione adatta di materiali, cellule e tecniche di produzione consente un supporto per la rigenerazione ed è cruciale per realizzare una terapia promettente per imitare al meglio la composizione e la funzione del tessuto nativo [29].

Nel caso particolare della cura delle lesioni della cartilagine, si possono utilizzare scaffold di origine naturale o sintetica e si può fare ricorso ai condrociti autologhi oppure alle cellule staminali mesenchimali. L'approccio del trapianto cellulare possiede alcuni potenziali vantaggi rispetto ad altre tecniche di riparazione della cartilagine in quanto minimizza l'ulteriore danno cartilagineo, riduce la dipendenza dai donatori mediante la coltura di cellule in vitro, può imitare i processi biologici naturali di sviluppo della cartilagine e può fornire tipi di cellule adatte a una migliore riparazione [13]. Gli scaffold basati su biomateriali sono stati quelli più promettenti per la semina cellulare, sia in vivo che in vitro [29]. Tra le varie classi di biomateriali, negli ultimi anni sono stati ampiamente studiati i nano-biomateriali di natura piezoelettrica, portando a notevoli progressi [30]. Lo studio approfondito delle loro proprietà e la ricerca su loro utilizzo renderanno i nanomateriali piezoelettrici ancora più interessanti per l'applicazione in campo terapeutico e nella medicina rigenerativa. In questo contesto, si nota come lo sviluppo delle nanotecnologie e della scienza dei materiali possono permettere di identificare approcci terapeutici alternativi a quelli attuali.

## **CAPITOLO 3    La piezoelettricità**

Per la rigenerazione di un tessuto danneggiato risulta importante la scelta del materiale per la progettazione e la realizzazione dello scaffold, cioè la matrice di supporto. Sono molteplici i materiali che sono studiati e valutati in questo settore, ma la loro applicabilità richiede un'attenta analisi: il rischio è quello di creare scaffold passivi in grado semplicemente di assicurare supporto alle cellule, senza favorirne in alcun modo la migrazione o la differenziazione. Questa passività potrebbe diventare un problema specialmente nel caso dei tessuti complessi, in cui la crescita non controllata delle cellule potrebbe portare alla formazione di nuova matrice extracellulare indesiderata. Per rimediare a queste limitazioni è possibile creare scaffold con un comportamento "attivo" in grado di promuovere i corretti processi cellulari, utili alla formazione del tessuto desiderato.

È su questi materiali bioattivi che ci si è concentrati maggiormente nell'ultimo decennio, andando a studiare le loro caratteristiche, rendendoli materiali alternativi e "intelligenti", da cui il nome "smart biomaterials". Con questo attributo si indicano dei materiali che riescono a modificare le proprie proprietà funzionali e strutturali attraverso stimoli esterni o modifiche delle condizioni circostanti. Questi materiali sono capaci di rispondere a stimoli diversi di natura fisica (temperatura, luce, campi elettrici o magnetici), chimica (pH, concentrazione) e meccanica (stress, deformazione) [24]. A questa classe di biomateriali appartengono anche quelli caratterizzati dalla piezoelettricità, cioè la capacità di generare carica elettrica in risposta alla deformazione e viceversa [31].

### **3.1 Caratteristiche dei materiali piezoelettrici**

La piezoelettricità è la proprietà di alcuni materiali cristallini di polarizzarsi generando una differenza di potenziale elettrico se soggetti a deformazione meccanica, e al tempo stesso di deformarsi in maniera elastica se sottoposti ad una tensione elettrica. Per questo motivo, i materiali piezoelettrici sono in grado di trasformare l'energia meccanica in energia elettrica e viceversa. Questo effetto si verifica come risultato della formazione di un momento dipolare netto e della successiva polarizzazione del materiale [31]. L'effetto si manifesta solo lungo una determinata direzione e le deformazioni ad esso associate sono dell'ordine dei nanometri.

La proprietà fondamentale dei materiali piezoelettrici è l'anisotropia, cioè la mancanza di un centro di simmetria nella cella elementare del materiale; ben 20 classi cristallografiche su 32 non hanno un centro di simmetria e sono quindi potenzialmente piezoelettriche. La struttura di tali cristalli è costituita da microscopici dipoli elettrici che, in condizioni di quiete, sono disposti



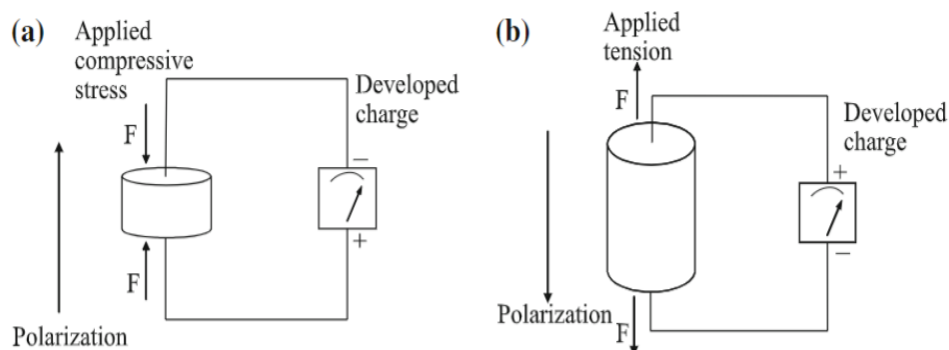
in maniera tale che tutte le facce del cristallo abbiano lo stesso potenziale elettrico. Quando si applica una forza esterna per comprimere il cristallo, la struttura cristallina si deforma e la condizione di neutralità elettrica del materiale viene persa, per cui una faccia del cristallo risulta carica negativamente e la faccia opposta risulta carica positivamente; l'asimmetria aumenta ulteriormente, così come il momento dipolare netto, che risulta essere maggiore di zero e che porta alla polarizzazione attraverso la distribuzione ordinata dei dipoli.

Quando al cristallo viene applicata una forza di trazione, il segno della carica elettrica di tali facce si inverte. Il cristallo si comporta dunque come un condensatore al quale è stata applicata una differenza di potenziale. Quindi se le due facce vengono collegate tramite un circuito esterno, viene generata una corrente elettrica, detta corrente piezoelettrica. Al contrario, quando si applica una differenza di potenziale, il cristallo si espande o si contrae lungo un asse determinato: i dipoli si allineano creando una polarizzazione netta che rimane anche quando viene tolta la stimolazione elettrica. L'espansione volumetrica è facilmente pilotabile ed è strettamente dipendente dalla stimolazione elettrica [32].

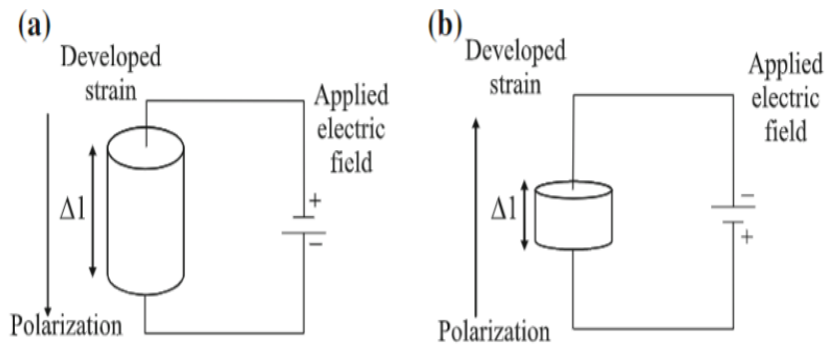
Un altro parametro che caratterizza i materiali piezoelettrici è la temperatura di Curie, cioè la temperatura sopra la quale i cristalli perdono l'effetto piezoelettrico, diventando isotropi.

Alcuni materiali piezoelettrici sono inizialmente non polari e generano carica solo sotto sforzo. Altri sono permanentemente polari e hanno momenti di dipolo netto senza alcuna applicazione di forza [31]. In generale essi manifestano due comportamenti:

- l'effetto piezoelettrico diretto (o generatore), in cui l'imposizione di uno stimolo meccanico di deformazione comporta una polarizzazione elettrica (Figura 3.1);
- l'effetto piezoelettrico inverso (o motore), in cui l'applicazione di un campo elettrico produce una risposta meccanica nel materiale (Figura 3.2) [24].



**Figura 3.1** Effetto piezoelettrico diretto con applicazione di uno stimolo meccanico a compressione (a) e a trazione (b): trasformazione di stimolo meccanico in stimolo elettrico [33].



**Figura 3.2** Effetto piezoelettrico inverso con applicazione di un campo elettrico di un segno (a) e di segno opposto (b): trasformazione di stimolo elettrico in stimolo meccanico [33].

La piezoelettricità fu scoperta da Paul-Jacques e Pierre Curie nel 1880 in cristalli di quarzo e sale di Rochelle. In seguito, nel 1957, Fukada e Yasuda scoprirono l'effetto piezoelettrico nell'osso; questa scoperta in ambito biologico ispirò studi approfonditi sugli effetti elettromeccanici dell'osso e sul suo ruolo nel modulare il comportamento cellulare e nel controllare la crescita e i processi di rigenerazione ossea [31]. Con queste scoperte si notò che l'allungamento e la compressione generavano tensioni di polarità opposta e proporzionali al carico applicato. Da qui deriva la scelta del termine “piezoelettricità” per indicare questo comportamento: infatti in greco “piezein” significa pressione e di conseguenza il termine viene tradotto con “elettricità indotta dalla pressione” [33].

Recentemente i materiali che possiedono questa proprietà hanno assunto molta importanza per via delle loro caratteristiche; essi hanno un'ampia varietà di applicazioni elettroniche, come trasduttori, attuatori e sensori [24]. Anche in ambito medico il loro utilizzo risulta efficace. Infatti, la capacità di generare cariche elettriche se sottoposti ad uno stress meccanico, e viceversa, li rende un'ottima scelta per applicazioni in cui è necessaria la trasduzione elettromeccanica del segnale. Nel caso biomedico, i materiali piezoelettrici hanno applicazioni significative nell'ingegneria tissutale come matrice elettroattiva per la riparazione e la rigenerazione dei tessuti. Possono fornire uno stimolo elettrico variabile senza una fonte di alimentazione esterna: il semplice movimento meccanico delle articolazioni, associato a uno scaffold piezoelettrico, può causare variazioni di energia elettrica. La stimolazione elettrica risultante può rigenerare e riparare i tessuti attraverso percorsi definiti. Gli scaffold piezoelettrici con proprietà ottimizzate possono produrre segnali bioelettrici adeguati, simili a quelli della matrice extracellulare naturale che sono stati osservati durante il fenomeno di rimodellamento nelle ossa e nella cartilagine [24].

### 3.2 Coefficienti piezoelettrici

Per valutare la capacità di un materiale a manifestare l'effetto piezoelettrico è necessario poterlo quantificare. Di qui la necessità di definire dei parametri specifici, che mettano in relazione il comportamento meccanico con quello elettrico. L'effetto piezoelettrico è descritto da tre coefficienti:  $d_{ij}$ ,  $g_{ij}$ ,  $k_{ij}$ . Essi sono legati alla composizione del materiale e dipendono dalla struttura del cristallo [34].

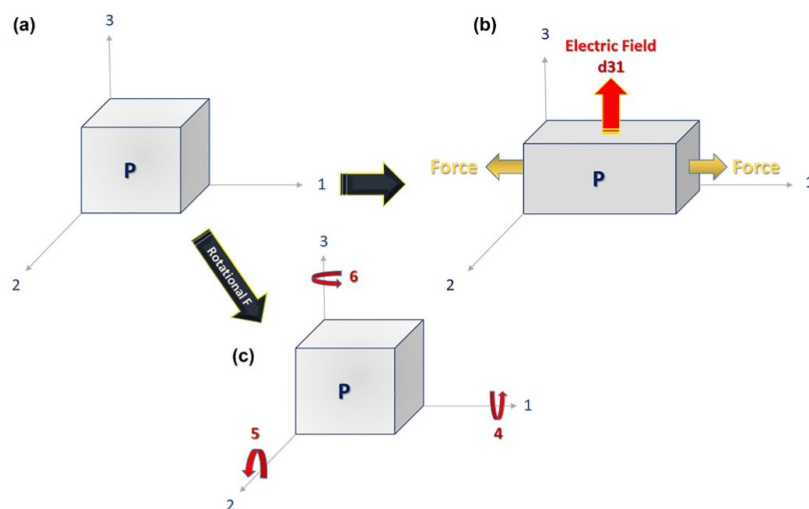
Le formule per il calcolo di questi parametri sono:

$$D = \varepsilon E + dP \quad \text{per l'effetto piezoelettrico diretto}$$

$$S = \frac{1}{Y}P + dE \quad \text{per l'effetto piezoelettrico inverso}$$

con  $D$  spostamento elettrico ( $C/m^2$ ),  $\varepsilon$  costante dielettrica ( $C^2/Nm^2$ ),  $E$  campo elettrico ( $V/m$ ),  $P$  tensione meccanica ( $N/m^2$ ),  $S$  deformazione ( $m/m$ ),  $Y$  modulo di Young ( $N/m^2$ ) [30].

Il coefficiente piezoelettrico  $d$ , il più comunemente usato, si riferisce alla polarizzazione generata per unità di stress meccanico, misurata in Coulomb/Newton ( $C/N$ ) o, in alternativa, alla deformazione meccanica del materiale piezoelettrico generata per unità di campo elettrico applicata, misurata in Metro/Volt ( $m/V$ ). Queste unità sono intercambiabili [35]. Nel caso di piezoelettricità diretta, nel termine  $d_{ij}$ , il pedice "i" rappresenta la direzione della forza applicata e il pedice "j" indica la direzione del campo elettrico generato. Il pedice "i" assume valori tra 1 e 3, mentre il pedice "j" tra 1 e 6. Inoltre, se viene imposta una forza rotazionale in tre direzioni, si genera un campo elettrico nelle altre tre direzioni (Figura 3.3).



**Figura 3.3** Derivazione del coefficiente di carica piezoelettrica  $d$ : materiale piezoelettrico senza forze meccaniche applicate (a), materiale sottoposto a una forza applicata in direzione 1 genera campo elettrico in direzione 3 (definito da  $d_{31}$ ) (b), materiale sottoposto a forze in direzione 1, 2, 3 genera un campo elettrico in direzione 4,5,6 rispettivamente (c) [25].

Quindi, per il meccanismo inverso, il coefficiente piezoelettrico di deformazione (o di trasmissione)  $d$ , misurato in  $m/V$ , consente di ricavare la risposta meccanica a uno stimolo elettrico, mentre per il meccanismo diretto, il coefficiente piezoelettrico di tensione elettrica (o di ricezione)  $g$ , misurato in  $Vm/N$ , consente di ricavare la risposta elettrica a uno stimolo meccanico. Perciò risulta che:  $g = \frac{d}{\epsilon}$  [32].

Infine viene definito il coefficiente piezoelettrico di accoppiamento (adimensionale)  $k$  che rappresenta il rapporto tra energia immagazzinata in forma elettrica (o meccanica) ed energia applicata in forma meccanica (o elettrica) [25].

Definiti questi coefficienti, risulta fondamentale la correttezza della loro misurazione nel materiale di interesse. La misurazione accurata del coefficiente piezoelettrico di un materiale dipende principalmente dalla preparazione del campione e dai metodi di misurazione. Recentemente sono state sviluppate diverse tecniche per misurare il coefficiente piezoelettrico, ad esempio il metodo della frequenza, l'interferometria laser, il metodo quasi statico, la microscopia a forza dipendente dalla piezoelettricità (PFM) [32].

### **3.3 Piezoelettricità nella fisiologia della cartilagine umana**

Gran parte della materia biologica presenta proprietà piezoelettriche. Ciò è dovuto alla comune struttura non centrosimmetrica di macromolecole contenenti gruppi polari, come i componenti della matrice extracellulare dei tessuti nativi, che consentono la generazione di momenti dipolari netti a seguito del carico meccanico [35]. La piezoelettricità può infatti essere considerata una proprietà intrinseca di molti tessuti come la pelle, i legamenti, l'osso, la cartilagine [22]. Nel complesso, le proprietà elettriche hanno un impatto significativo sulla funzione tissutale, essendo direttamente coinvolte nei meccanismi di rigenerazione dei tessuti ed essendo responsabili della modulazione del comportamento cellulare: questi effetti sono il risultato della bioelettricità. Infatti, i campi elettrici endogeni svolgono un ruolo cruciale non solo nella generazione e nella propagazione dei potenziali d'azione nelle vie di segnalazione nervosa, ma anche nel controllo di altre funzioni cellulari, come la proliferazione, l'espressione genica, la differenziazione e la migrazione cellulare [34]. Proprio a causa dell'importanza della bioelettricità nelle funzioni delle cellule del corpo umano, la stimolazione elettrica ha da sempre avuto un ruolo importante nella fisiologia umana: l'elettroterapia si è sviluppata per migliorare le applicazioni biomediche, come la guarigione delle ferite e la rigenerazione dei tessuti. Ad oggi, però, le terapie basate su stimoli elettrici richiedono elettrodi invasivi per via percutanea o dispositivi transcutanei, che in genere mancano di efficacia e risoluzione spaziale [34][35].

La complessità e i disagi per i pazienti associati all'elettroterapia hanno dato il via alla ricerca e allo sviluppo di metodi per la rigenerazione del tessuto cartilagineo senza l'uso di una stimolazione elettrica esterna.

La ricerca si è perciò orientata verso lo studio del collagene, la proteina che costituisce la maggior parte della cartilagine, che è risultato essere responsabile della piezoelettricità. La sua struttura non centrosimmetrica, a causa della distribuzione non uniforme dei gruppi carichi lungo la tripla elica, genera momenti di dipolo e, se viene sottoposta a carico, si crea un potenziale netto che agisce dalla superficie della molecola di collagene [11]. Il collagene risulta avere un coefficiente piezoelettrico che varia tra 0,2 e 0,7 pC/N [35][36].

È importante considerare che le proprietà piezoelettriche della cartilagine sono influenzate dall'invecchiamento e dalla degenerazione dei tessuti, dati gli effetti di questi fattori sulla composizione dell'ECM dei tessuti e sulle loro proprietà meccaniche [35].

In ambiente fisiologico, la forza di compressione sulle fibre di collagene all'interno della ECM porta alla riorganizzazione del momento di dipolo: i gruppi polari cambiano conformazione e si orientano nella direzione della sollecitazione applicata, inducendo un momento dipolare intorno all'asse della molecola [37]. Questa perturbazione dell'elettroneutralità, che si verifica in molti siti diversi nelle molecole tese di collagene, genera una polarizzazione netta in superficie [11]. Di conseguenza, il segnale elettrico raggiunge la membrana cellulare, portando all'apertura di canali del calcio voltaggio-dipendenti [24]. Recentemente sono stati scoperti alcuni canali mecano-sensibili associati alla piezoelettricità; quelli definiti "piezo-1" sono responsabili del catabolismo della cartilagine, mentre i "piezo-2" sono associati all'anabolismo della cartilagine [32][38]. L'aumento della concentrazione di calcio intracellulare attiva la calmodulina, che in seguito stimola l'attivazione della calcineurina: questa catena di attivazioni sequenziali porta alla defosforilazione del fattore nucleare delle cellule attivate NF-AT (Nuclear Factor of Activated Cells), che si trasferisce nel nucleo, dove, insieme ad altri fattori di trascrizione, regola l'espressione di alcuni fattori di crescita, tra cui il fattore di crescita trasformante  $\beta$  TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor- $\beta$ ) e le proteine morfogenetiche dell'osso BMP (Bone Morphogenetic Proteins), che svolgono un ruolo cruciale nella formazione della cartilagine e dell'osso [24][39]. Quindi, quando la cartilagine articolare è sottoposta a stress meccanico, attraverso la sequenza dei processi descritti, i segnali elettrici interni vengono prodotti da fibre di collagene di tipo II che innescano la produzione di ECM, la crescita cellulare e la rigenerazione dei tessuti, ottimizzando così la risposta meccanica del tessuto [25][35].

È quindi evidente che il collagene piezoelettrico della cartilagine articolare è soggetto al meccanismo fisiologico descritto, dovuto a forze meccaniche che generano potenziali elettrici.

Per questo, il potenziale generato dalla deformazione, definito con il termine SGP da “strain-generated potential”, è sempre più oggetto di studio per i ricercatori nell’ambito dell’ingegneria tissutale. Il ruolo dell’SGP nel meccanismo di trasduzione mecano-elettrica è associato ai flussi diffusivi degli ioni [11]. Il loro movimento è guidato dal gradiente di pressione idrostatica, una delle forze più importanti che agiscono sulle cellule cartilaginee a causa dell’elevato contenuto di acqua. La pressione idrostatica è infatti strettamente legata alla piezoelettricità: la variazione della polarizzazione varia la densità di carica elettrica e la conseguente risposta cellulare [40].

Il fenomeno della piezoelettricità naturale della cartilagine è stato per molto tempo inesplorato come potenziale strategia nel campo dell’ingegneria tissutale, ma negli ultimi anni si sta rivelando una strategia promettente per future applicazioni [28]. In quest’ambito, in cui il tessuto ingegnerizzato dovrà essere sottoposto a un carico meccanico fisiologico, la riproduzione delle caratteristiche della cartilagine naturale è uno degli obiettivi del Tissue Engineering. Poiché nella piezoelettricità diretta si è notato che la quantità di carica prodotta è proporzionale alla quantità di forza esterna applicata, studiare la naturale caratteristica piezoelettrica dei tessuti sarà essenziale per la produzione di matrici che rispettino i parametri naturali. Pertanto, le matrici piezoelettriche possono essere impiantate in un’articolazione per autoprodotte stimolazione elettrica sotto il movimento dell’articolazione, fungendo potenzialmente come uno stimolatore elettrico “spontaneo” per promuovere la ricrescita della cartilagine. Una combinazione di matrici piezoelettriche e movimento articolare indotto dall’esercizio fisico potrebbe controllare la carica prodotta e ottenere una migliore guarigione della cartilagine ialina [16][19]. Oltre al naturale movimento articolare si potrebbero usare stimoli esterni per applicare lo stress meccanico come gli ultrasuoni [16].

Quest’approccio innovativo è basato sull’utilizzo di scaffold elettroattivi, che imitano i coefficienti piezoelettrici dei tessuti naturali [24]. Per questo motivo, dalla scoperta della piezoelettricità nella cartilagine, la ricerca scientifica si è orientata verso lo studio dei biomateriali piezoelettrici, che possiedono una capacità innata di segnalazione elettrica e che sono utili per applicazioni in medicina rigenerativa [25][39].

## **CAPITOLO 4 I materiali piezoelettrici per la rigenerazione della cartilagine**

Le caratteristiche piezoelettriche dei materiali sottoposti a deformazione vengono studiate al fine di simulare il microambiente bioelettrico naturale e di generare una risposta biologica stimolante. Il crescente interesse verso i materiali caratterizzati da queste proprietà ha portato ad un aumento di studi e ricerche nell'ambito dell'ingegneria tissutale: l'obiettivo è sia quello di ricercare nuovi materiali, sia quello di analizzare le caratteristiche di quei materiali già noti per la piezoelettricità, nell'ottica di una loro applicazione in un contesto biologico. Gli studi stanno inoltre dimostrando gli effetti biologici innescati da nanoparticelle piezoelettriche stimulate dagli ultrasuoni, aumentando così continuamente l'interesse scientifico per la stimolazione elettrica indiretta ottenuta attraverso nanoparticelle piezoelettriche che agiscono come nanotrasduttori a livello di tessuti e cellule.

Nell'ambito della medicina rigenerativa, i materiali piezoelettrici stanno trovando applicazione per la riparazione di tessuti danneggiati, come quello osseo, nervoso, cardiovascolare, epiteliale [29]. Per quanto riguarda la cartilagine, si studiano quei materiali che sono sensibili all'ambiente meccanico naturale, cioè alla stimolazione provocata dalle forze derivanti dal movimento articolare, e che hanno la capacità unica di rispondervi.

L'origine della piezoelettricità va ricercata nella struttura chimica dei materiali; si è dimostrato che nei composti organici, la piezoelettricità è dovuta al riposizionamento dei dipoli molecolari, mentre nei materiali inorganici è causata da uno spostamento relativo delle specie ioniche [34]. I materiali piezoelettrici utilizzati nell'ingegneria tissutale della cartilagine possono essere suddivisi in base alla loro origine chimica in polimeri, ceramici e compositi [16].

### **4.1 Materiali polimerici piezoelettrici**

I polimeri piezoelettrici hanno assunto importanza nelle applicazioni biomediche a causa della loro semplice struttura e della loro flessibilità. Le proprietà strutturali che caratterizzano un polimero piezoelettrico sono: l'esistenza di dipoli molecolari permanenti, la capacità di allineare e orientare i dipoli molecolari, la capacità di mantenere l'allineamento del dipolo una volta che sia stato raggiunto e la presenza di proprietà meccaniche adeguate che permettano di tollerare grandi deformazioni sotto sollecitazioni meccaniche [24], [25]. I materiali polimerici piezoelettrici non richiedono energia o potenza per indurre cariche superficiali transitorie [16]. Si distinguono in base alla loro origine in naturali e sintetici.

#### *4.1.1 Polimeri naturali*

I polimeri naturali sono biomateriali prodotti da organismi viventi e in quanto tali mostrano un'eccellente biocompatibilità e basso potenziale immunogenico. La proprietà che li contraddistingue è l'ottima riassorbibilità, che si basa su processi di degradazione enzimatica e idrolitica [11]. Essi mostrano un'efficace segnalazione biologica e promuovono l'adesione, la proliferazione e la differenziazione cellulare, fornendo supporto per la rigenerazione della cartilagine [16]. Sono inoltre importanti per favorire l'integrazione nella regione subcondrale. La bassa resistenza meccanica e l'alta velocità di degradazione rappresentano i principali svantaggi dei polimeri; questo porta a non utilizzare questi biomateriali singolarmente, ma in associazione con altri o conseguentemente a modificarne le proprietà chimiche attraverso cross-linking, che da un lato migliora la resistenza meccanica ed aumenta il tempo di degradazione, mentre dall'altro può causare effetti tossici, diminuendo la biocompatibilità del materiale [24], [35].

Sono di seguito riportati i polimeri naturali piezoelettrici più utilizzati per la rigenerazione cartilaginea.

#### *Chitosano*

I materiali a base di chitosano sono stati riconosciuti come un microambiente idrofilico adatto per l'adesione, la proliferazione e la differenziazione dei condrociti durante la formazione della cartilagine articolare [41]. Il chitosano è un polisaccaride derivato dalla deacetilazione alcalina della chitina [16]. Ha un coefficiente piezoelettrico  $d = 0,2-1,5$  pC/N [16]. In soluzione acquosa, i gruppi amminici vengono protonati e il polimero assume una carica positiva: questo fattore incrementa la sua bioadesività a causa della buona interazione con la carica negativa, caratteristica delle molecole e delle membrane biologiche [16].

Questo polimero piezoelettrico naturale è usato soprattutto per le proprietà di biocompatibilità, biodegradabilità, buona porosità, non tossicità, notevole affinità per le proteine e resistenza batterica [35], [41]. Ha inoltre un basso costo [25]. Presenta però scarse proprietà meccaniche, che rendono difficile la sua diretta applicazione; per questo motivo si è pensato di mescolarlo con altri polimeri sintetici [35]. All'interno di un composito, il chitosano diventa infatti adatto per la rigenerazione ossea e cartilaginea [24].

È disponibile in diverse forme (film, gel, spugne, fibre, nanoparticelle, nanofibre) e quindi è adatto a molteplici applicazioni nell'ingegneria tissutale, promuovendo il processo di guarigione dei tessuti connettivi molli e duri. Recentemente, studi in vitro hanno suggerito che il chitosano potrebbe promuovere l'espressione di proteine specifiche della cartilagine e ridurre



la produzione di mediatori infiammatori e catabolici da parte dei condrociti. Inoltre, in un modello di coniglio con osteoartrite indotta, si è visto che il chitosano previene la degradazione della cartilagine e l'infiammazione della membrana sinoviale [41].

Oltre che per la creazione di matrici per la crescita cellulare, è anche usato per la fabbricazione di sensori biodegradabili [25]. In ambito biomedico, è inoltre utile per guarire le ferite e per il rilascio controllato di farmaci.

### *Cellulosa*

La cellulosa è un omopolimero di glucosio usato per creare scaffold per la rigenerazione della cartilagine [16]. Ha un coefficiente piezoelettrico  $d = 0,2 \text{ pC/N}$  [16]. Presenta diversi vantaggi, tra cui eccellente biocompatibilità, biodegradabilità, elevata resistenza a trazione e capacità di promuovere una significativa adesione cellulare [35]. Tuttavia, la piccola dimensione dei pori e la formazione di reti concentrate di fibre limitano la penetrazione cellulare, ma questo problema viene risolto con l'aiuto di particelle porogene: è infatti possibile controllare la dimensione dei pori e l'interconnettività delle fibre variando la concentrazione, la dimensione e la geometria degli agenti porogeni aggiunti nella soluzione polimerica [24], [25].

### *Collagene*

Il collagene, essendo il componente fondamentale del tessuto cartilagineo, viene frequentemente applicato nell'ingegneria tissutale osteocondrale in virtù delle sue eccellenti proprietà biologiche come biocompatibilità, biodegradabilità, bassa antigenicità, idrofilicità e non citotossicità [35]. Esso ha un coefficiente piezoelettrico  $d = 0,2-2 \text{ pC/N}$ : a causa del suo basso valore, viene spesso combinato con alcune piezoceramiche per migliorare la piezoelettricità [25], [35].

Nonostante i suoi vantaggi, l'uso del collagene nell'ingegneria tissutale è fortemente ostacolato dalla rapida degradazione e dalle scarse proprietà meccaniche, in particolare la bassa rigidità [35]. Un altro limite è rappresentato dalla tossicità degli agenti reticolanti, usati per ridurre il tasso di degradazione. Infatti i trattamenti fisici non sono in grado di fornire il livello richiesto di reticolazione per l'ingegneria tissutale; di conseguenza, sono necessari metodi chimici che permettano di imitare le triple eliche del collagene naturale. Viene per esempio usata la glutaraldeide per creare un'impalcatura durevole, con un basso grado di degradazione. A causa della tossicità di questi agenti reticolanti chimici si stanno cercando molecole bioattive in grado di stabilizzare il collagene senza causare tossicità. In uno studio si è notato che utilizzando il

polifenolo come agente reticolante si ottengono matrici con buone proprietà chimiche e fisiche, riducendo al minimo l'effetto citotossico e aumentando il tempo di degradazione [25].

#### *4.1.2 Polimeri sintetici*

I polimeri sintetici rappresentano una soluzione ai problemi derivanti dai materiali di origine naturale, quali il tasso di degradazione non controllabile e la non adeguata resistenza meccanica. Infatti, i materiali sintetici hanno proprietà fisiche e meccaniche regolabili, conformi al tipo di tessuto che si desidera rigenerare: è possibile, attraverso la loro realizzazione sintetica industriale, definire il grado di cristallinità [16]. Possono essere facilmente fabbricati in diverse forme e permettono un maggiore controllo sulle caratteristiche fisico-chimiche degli scaffold come porosità e solubilità, consentendo un controllo sulla velocità di degradazione. A differenza dei biomateriali di derivazione naturale, essi non presentano variabilità e consentono una produzione su larga scala. Tuttavia, essi presentano una maggiore possibilità di reazioni avverse causate dalla produzione di sottoprodotti derivanti dalla degradazione.

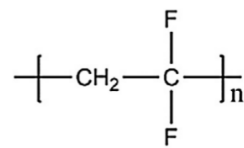
I materiali sintetici di seguito descritti hanno dimostrato di promuovere l'adesione e la proliferazione delle cellule condrogeniche: le fibre piezoelettriche stimolano le cellule differenziabili in un fenotipo maturo e promuovono la riparazione dei tessuti. Utilizzando le proprietà piezoelettriche, infatti, rigenerano rapidamente la cartilagine, formando un neotessuto che si integra bene con quello adiacente [16].

Vengono di seguito presentati i principali polimeri sintetici usati per la rigenerazione cartilaginea.

#### *PVDF (polivinilidenfluoruro) / PVDF-TrFE (polivinilidenfluoruro-trifluoroetilene)*

Il PVDF è un polimero termoplastico semicristallino costituito da due domini di fluoro polari legati ad ogni secondo atomo di carbonio dell'unità ripetitiva della catena polimerica (Figura 4.1). Esso ha un coefficiente piezoelettrico  $d = 34 \text{ pC/N}$  [35]. A seconda della disposizione dei gruppi polari, ha diverse forme cristalline, tra cui  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  (Figura 4.2). Mentre nella fase  $\alpha$ , la più termodinamicamente favorita, le catene polimeriche sono disposte in modo tale che i dipoli molecolari diventino antiparalleli, creando una struttura cristallina non polare e non piezoelettrica, nella fase  $\beta$  i gruppi polari del fluoro sono paralleli e disposti sullo stesso lato della catena di carbonio, generando così un elevato momento dipolare netto e contribuendo alla piezoelettricità del polimero [35]. Poiché il PVDF si trova per lo più nella sua fase  $\alpha$ , sono state sviluppate diverse strategie, come l'aggiunta di nanoparticelle di ossido di grafene o nanotubi di carbonio, per aumentare il contenuto di fase  $\beta$  e quindi per migliorarne la piezoelettricità. A

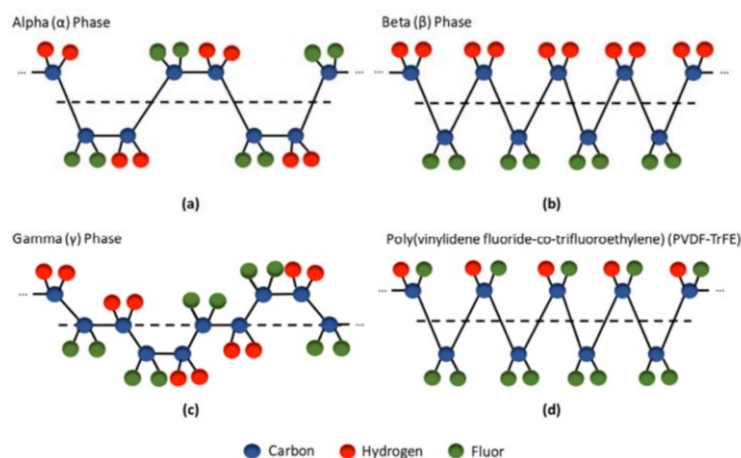
seconda della disposizione del dipolo, la superficie del PVDF viene caricata con una carica netta positiva o negativa che influisce sulla sua interazione con le cellule. Le cariche negative e la struttura porosa promuovono l'adesione di cellule e proteine, migliorando la biocompatibilità del polimero sintetico [25], [35]. L'elevato coefficiente piezoelettrico del  $\beta$ -PVDF, unito alla sua flessibilità, alla facilità di lavorazione, all'elevata resistenza chimica e fisica, hanno reso questo polimero uno dei più comunemente utilizzati nelle applicazioni dell'ingegneria tissutale [35].



**Figura 4.1** Unità monomerica del PVDF [42].

Per favorire e mantenere la cristallinità  $\beta$ , il PVDF viene spesso copolimerizzato. Si crea perciò il PVDF-TrFE, che è un copolimero di fluoruro di vinilidene (VDF) e tri-fluoroetilene (TrFE) (Figura 4.2) [34]. Esso presenta un coefficiente piezoelettrico  $d = 38 \text{ pC/N}$  [35]. L'alto valore di questo coefficiente spiega l'influenza positiva sull'adesione e sulla proliferazione cellulare [24]. Per aumentare ulteriormente il contenuto in fase  $\beta$ , e quindi il carattere piezoelettrico, è possibile polarizzare il PVDF-TrFE, anche grazie al fatto che la sua temperatura di Curie risulta essere più bassa ( $65 \text{ }^\circ\text{C}$ ) rispetto a quella del PVDF ( $170 \text{ }^\circ\text{C}$ ) [35].

Si è studiato questo materiale soprattutto perché aiuta la differenziazione delle cellule mesenchimali in fenotipi maturi, promuovendo la riparazione cellulare.



**Figura 4.2** Fasi cristalline del PVDF: fase  $\alpha$  (a), fase  $\beta$  (b), fase  $\gamma$  (c) e PVDF-TrFE (d) [35].

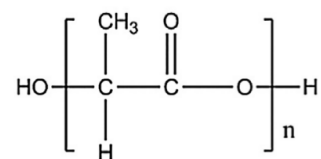
Se la biocompatibilità, la non citotossicità e l'alto coefficiente piezoelettrico rappresentano i principali vantaggi di questi materiali, la principale limitazione alla loro applicabilità è data dal fatto che sono polimeri non biodegradabili [35]. Per questo vengono spesso miscelati con polimeri naturali per sviluppare strutture di supporto adatte per la riparazione e rigenerazione dei tessuti.

#### *PLLA (acido poli-L-lattico)*

Il PLLA è un polimero semicristallino con struttura elicoidale (Figura 4.3). Ha un coefficiente piezoelettrico  $d = 9,82 \text{ pC/N}$  [35]. Il PLLA viene idrolizzato e degradato, generando come sottoprodotto il PLA, che non è tossico ed è solubile in acqua. Questo spiega la biocompatibilità, biodegradabilità e non tossicità del materiale [16], [24]. Esso mostra altri vantaggi come buone proprietà meccaniche, facilità di produzione, resistenza alla corrosione, non tossicità, solubilità in acqua, basso grado di degradazione [16], [35], [43].

Si presenta in tre forme cristalline ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ). Nella forma  $\alpha$ , la più termodinamicamente favorita, i dipoli sono orientati casualmente. La causa della piezoelettricità va ricercata nella presenza di gruppi carbonilici polari della sua struttura: questi vengono allineati, generando la forma  $\beta$ , quando il polimero è sottoposto a stress meccanico, presentando un'alta polarizzazione ed eccellenti proprietà piezoelettriche [16], [35].

Grazie alle sue proprietà meccaniche, questo materiale è già usato in chirurgia ortopedica per dispositivi di fissaggio temporaneo, come viti e perni [24], [35].



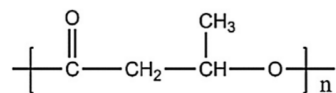
**Figura 4.3** Unità monomerica del PLLA [42].

#### *PHB (poli3-idrossibutirrato) /PHBV (poli3-idrossibutirrato-co-3-idrossivalerato)*

Il PHB e il PHBV sono dei poliidrossialcanoati (PHA), appartenenti alla famiglia dei poliesteri. Le proprietà piezoelettriche dei PHA sono dovute alla presenza di un carbonio asimmetrico legato al gruppo polare dell'ossigeno. I PHA, oltre ad essere piezoelettrici, sono biodegradabili, biocompatibili e termoplastici [29]. Sono idrolizzati in oligomeri e monomeri solubili in acqua, che vengono sfruttati dal nostro organismo come nutrienti e infine decomposti in anidride carbonica e acqua [29]. Rispetto ad altri polimeri, i biomateriali a base di PHA causano reazioni infiammatorie meno gravi. Le loro applicazioni biomediche sono però limitate a causa della

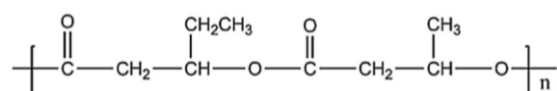
mancanza di tenacità, elasticità, idrofilicità e bioattività; tuttavia, la struttura chimica consente loro di combinarsi con altri polimeri o materiali inorganici per formare compositi ibridi con proprietà strutturali e funzionali migliori, riducendo la natura idrofobica che li caratterizza. La loro potenzialità di una graduale degradazione li rende materiali adatti per la creazione di matrici atte a supportare la crescita cellulare e la formazione di nuovo tessuto [31]. Sono spesso associati ad altri nanomateriali per migliorare la risposta piezoelettrica [29].

Il PHB ha un coefficiente piezoelettrico  $d = 1,6-2 \text{ pC/N}$  [35]. Analogamente al PLLA, la piezoelettricità del PHB è correlata alla presenza di gruppi carbonilici polari nella sua struttura cristallina (Figura 4.4). Rispetto ad altri polimeri piezoelettrici, il PHB ha il vantaggio di un lungo tempo di degradazione, che gli consente di sostenere la crescita di nuovo tessuto per periodi più lunghi. È anche biocompatibile, biodegradabile, non citossico e ha una buona stabilità [35]. Tuttavia, questo polimero è caratterizzato da scarse proprietà meccaniche a causa della sua rigidità e fragilità, ed è insolubile in acqua [31]. Nel complesso, così come il PLLA, il PHB può essere utilizzato per lo sviluppo di scaffold piezoelettrici, ma il basso coefficiente piezoelettrico, rispetto a PVDF e PVDF-TrFE, ha finora limitato le applicazioni nell'ingegneria tissutale, dove viene principalmente usato per le sue caratteristiche biologiche vantaggiose.



**Figura 4.4** Unità monomerica del PHB [42].

Un altro idrossialcanoato è il PHBV, che è più resistente meccanicamente, meno rigido e più flessibile rispetto al PHB (Figura 4.5) [31]. Esso è ottenuto dalla copolimerizzazione dell'acido 3-idrossibutanoico, che conferisce rigidità, e dell'acido 3-idrossipentanoico, che conferisce flessibilità. Il PHBV ha un coefficiente piezoelettrico  $d = 1.3 \text{ pC/N}$  [35]. È spesso associato ad altri materiali per permettere un tempo di degradazione più lungo e viene degradato secondo un meccanismo di degradazione enzimatica. Trattandosi di un poliestere, la degradazione avviene per idrolisi: si ha la formazione di molecole naturali di acido idrossibutirrico, che non risultano tossiche per l'organismo [41].



**Figura 4.5** Unità monomerica del PHBV [42].

## 4.2 Materiali ceramici piezoelettrici

I materiali ceramici si ottengono mediante sinterizzazione, un processo nel quale i grani delle polveri di partenza vengono saldati tra loro. I grani sono orientati statisticamente in tutte le direzioni e la loro dimensione può essere controllata dalle condizioni di produzione. Poiché i grani sono orientati in modo casuale, una ceramica dopo la sinterizzazione non è piezoelettrica perché i singoli contributi dei grani si compensano a vicenda. Per ottenere un comportamento piezoelettrico su scala macroscopica, è necessario passare attraverso un processo chiamato “polarizzazione” che consiste nell'applicare un forte campo elettrico, maggiore del campo coercitivo del materiale, per orientare i dipoli elettrici in una direzione preferenziale. Portare il campione a temperature elevate facilita il processo, ma è necessario non superare la temperatura di Curie [35]. Questa tecnica della polarizzazione ha permesso di controllare la fase e l'orientamento cristallografico [34].

La potenzialità delle piezoceramiche è avere un coefficiente piezoelettrico molto elevato. Problematica risulta però la loro citotossicità, che ne limita l'applicazione come biomateriali [24]. Le proprietà meccaniche dei ceramici sintetici dipendono dalla struttura policristallina che, a sua volta, è legata al processo di formazione del composto. Un fattore meccanico che limita l'utilizzo di questi materiali in forma pura è dato, in generale, dalla loro estrema fragilità che non consente la realizzazione di strutture portanti per zone sottoposte a particolare carico meccanico. A causa delle suddette caratteristiche, i materiali ceramici sono più frequentemente utilizzati come additivi.

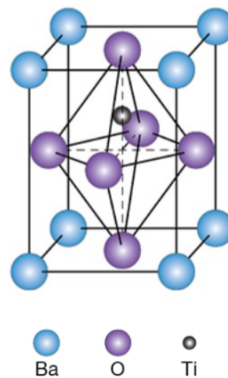
Sono di seguito descritti i materiali ceramici piezoelettrici più utilizzati per la rigenerazione della cartilagine.

### *BaTiO<sub>3</sub> (titanato di bario)*

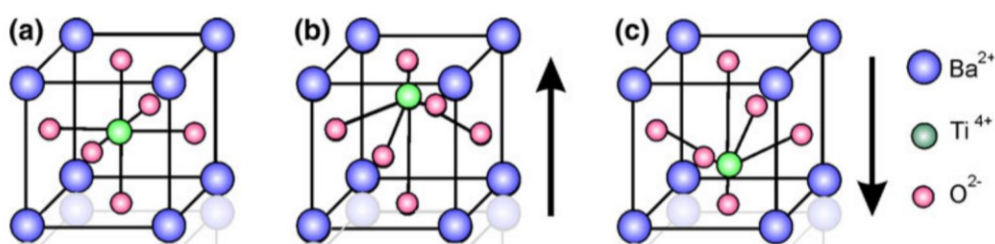
Il titanato di bario è un ossido ferroelettrico con una struttura perovskite. Il materiale è costituito da una struttura cristallina in cui gli ioni Ba<sup>2+</sup> occupano i vertici della cella cubica, gli ioni O<sup>2-</sup> si trovano al centro, formando un ottaedro, e lo ione Ti<sup>4+</sup> è al centro della cella cubica: in questa condizione, definita paraelettrica, il materiale non esibisce alcun comportamento ferroelettrico o piezoelettrico (Figura 4.6). Quando si trova a una temperatura maggiore della sua temperatura di Curie (120°C), lo ione Ti<sup>4+</sup> è centrato, mentre quando la soglia di Curie viene superata, questo ione si sposta leggermente verso l'alto o il basso dal centro della cella cubica rispetto agli anioni di ossigeno [44] (Figura 4.7). Questa asimmetria si traduce in una polarizzazione elettrica spontanea [34]. Infatti, quando viene applicato uno stress meccanico, gli ioni titanio (Ti<sup>4+</sup>) e ossigeno (O<sup>2-</sup>) cambiano posizione l'uno rispetto all'altro all'interno della struttura della

ceramica, portando all'accumulo di cariche negative sulla superficie e alla concentrazione di cariche positive all'interno del cristallo: si forma così un momento di dipolo. Di conseguenza, quando è incorporato in vivo in un tessuto portante, come quello osteocondrale, essendo soggetto a carichi naturali prodotti dalla mobilità scheletrica, questo materiale è in grado di attrarre dai fluidi biologici cationi diversi, come  $\text{Ca}^{2+}$ , migliorando la sua integrazione nel tessuto ospite [35].

Ha un coefficiente piezoelettrico  $d = 191 \text{ pC/N}$  [35]. È altamente biocompatibile e ha buone proprietà meccaniche, tra cui un elevato modulo di Young (118 GPa) e alta resistenza alla compressione (913 MPa). La non biodegradabilità del titanato di bario, unita alla sua natura fragile, alla scarsa stabilità termica e a segnali di citotossicità, costituiscono importanti limitazioni all'uso di questo biomateriale [35]. Per questo motivo è usato come additivo piezoelettrico.



**Figura 4.6** Cella cristallina del  $\text{BaTiO}_3$  [34].



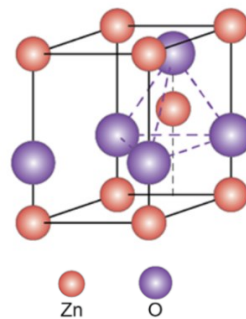
**Figura 4.7** Cella unitaria di  $\text{BaTiO}_3$  al di sopra della temperatura di Curie (a); al di sotto della temperatura di Curie lo spostamento dello ione  $\text{Ti}^{4+}$  verso l'alto (b) o verso il basso (c) determina la formazione del dipolo [44].

### *ZnO (ossido di zinco)*

L'effetto positivo dello zinco nella proliferazione e nella differenziazione delle cellule è di primaria importanza. Questo fenomeno si verifica a causa del fatto che lo zinco è in grado di regolare e promuovere l'attività di vari enzimi e di migliorare la proliferazione delle cellule del

tessuto osteocondrale [25]. Le nanoparticelle di ZnO hanno proprietà antibatteriche e hanno mostrato capacità di sintesi della cartilagine [24].

Ha un coefficiente piezoelettrico  $d = 12,4 \text{ pC/N}$  [35]. La struttura a wurtzite spiega il comportamento piezoelettrico (Figura 4.8). A differenza del titanato di bario, però, l'ossido di zinco non mostra polarizzazione elettrica spontanea a meno che il reticolo non sia meccanicamente deformato [34]. Le nanoparticelle di ZnO hanno trovato molte applicazioni in biomedicina in ragione della loro biocompatibilità, attività antimicrobica e buone proprietà chimiche e fisiche, esibendo un modulo di Young di 140 GPa: vengono infatti incorporate in altri materiali sia a causa del comportamento piezoelettrico sia per migliorare le proprietà meccaniche dei vari scaffold [24], [35].



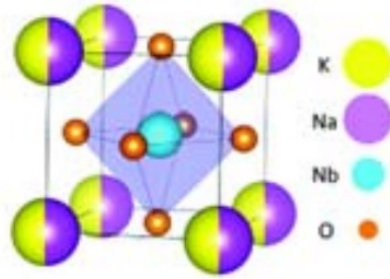
**Figura 4.8** Cella cristallina del ZnO [34].

#### *KNN (niobato di potassio e sodio)*

Il KNN ha una struttura a perovskite ed è caratterizzato da un alto coefficiente piezoelettrico: presenta infatti un coefficiente piezoelettrico  $d = 63 \text{ pC/N}$  (Figura 4.9) [35]. Altri vantaggi sono la buona biocompatibilità e la stabilità termica. Questo materiale presenta anche notevoli effetti antibatterici e bassa citotossicità, associati alla capacità di promuovere l'adsorbimento proteico e la proliferazione cellulare; è anche caratterizzato da un alto modulo di Young (104 GPa) [35]. In diversi casi, l'aggiunta di ioni di litio ( $\text{Li}^+$ ) ha permesso di aumentare l'effetto piezoelettrico e quindi la proliferazione delle cellule nel tessuto desiderato ma, allo stesso tempo, ha aumentato il rischio di tossicità [24].

Grazie alla polarizzazione, la procedura di fabbricazione delle particelle KNN è stata migliorata per ottenere un coefficiente piezoelettrico fino a 700 pC/N ottimizzando la sua caratteristica anisotropa e facilitando la progettazione di dispositivi piezoelettrici ad alte prestazioni [34].





**Figura 4.9** Cella cristallina del KNN [35].

### 4.3 Materiali piezoelettrici compositi

I materiali compositi sono dati dalla combinazione di due o più materiali con l'obiettivo di abbinare le caratteristiche ottimali dei singoli elementi, superando gli svantaggi dei materiali presi singolarmente per creare così una struttura che meglio si adatti al ruolo di scaffold. Infatti, il principale limite dell'applicazione di scaffold piezoelettrici nell'ingegneria del tessuto cartilagineo è la non biodegradabilità dei biomateriali piezoelettrici. Sebbene siano disponibili materiali biodegradabili, le loro scarse proprietà meccaniche e, soprattutto, i ridotti coefficienti piezoelettrici, ne ostacolano l'uso in applicazioni biomediche [16]. Per questo si sono sviluppati compositi costituiti da un piezopolimero e una piezoceramica in modo da combinare l'elevato coefficiente piezoelettrico dei ceramici con la biocompatibilità, la processabilità e la flessibilità dei polimeri. Questi compositi piezoelettrici presentano una migliore stabilità e proprietà meccaniche più adatte rispetto ai materiali analizzati singolarmente [35].

Nell'ambito dei compositi, l'accostamento polimero-ceramico, in opportune configurazioni e proporzioni, è sicuramente quello di maggior successo per la rigenerazione della cartilagine. Lo scaffold risultante può, in generale, essere ottenuto mescolando polveri ceramiche a soluzioni polimeriche, oppure utilizzando diverse tecniche di produzione, ad esempio depositando una componente ceramica in una matrice polimerica o una fase polimerica su una struttura ceramica. Le ceramiche bioattive sono ampiamente utilizzate sotto forma di nanoparticelle aggiunte a substrati polimerici. La presenza dei ceramici in generale migliora la resistenza alla compressione, il tasso di degradabilità e la capacità condrogenica dello scaffold, mentre la fase polimerica serve per mantenere una buona deformabilità.

## **CAPITOLO 5 L'ingegneria tissutale applicata al tessuto cartilagineo attraverso l'uso dei materiali piezoelettrici**

È evidente che i materiali piezoelettrici rappresentino un promettente mezzo per stimolare la rigenerazione della cartilagine. Per la loro applicazione è essenziale una buona combinazione tra scaffold, cellule ed eventuali fattori esterni.

### **5.1 Scaffold**

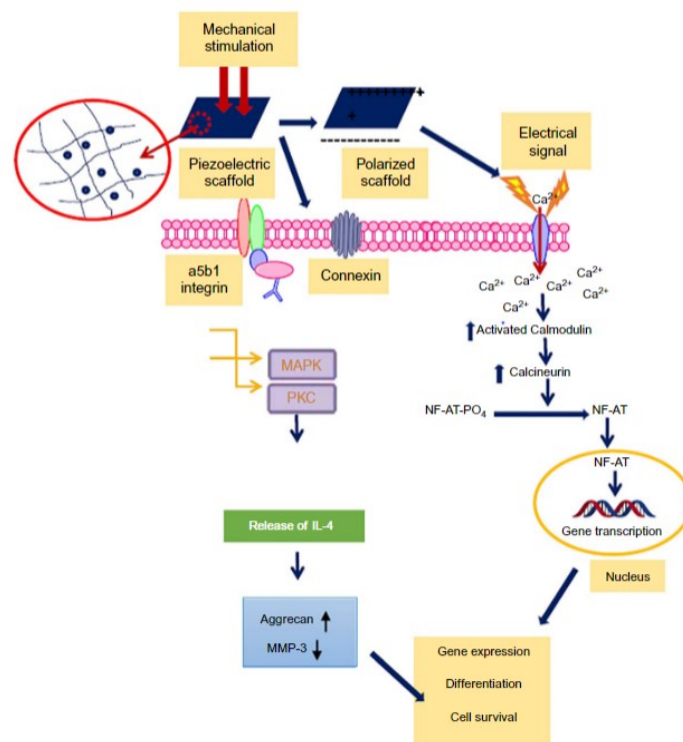
Creare una struttura adeguata che induca le cellule alla formazione di nuova matrice extracellulare e contemporaneamente funga essa stessa da matrice temporanea fino alla completa formazione del tessuto, è l'obiettivo principale dell'ingegneria tissutale: lo scaffold, che vuol dire letteralmente "impalcatura", deve permettere di ripristinare infatti la funzionalità dei tessuti. Grazie alle caratteristiche morfologiche nanometriche ingegnerizzate, lo scaffold riesce ad emulare la matrice extracellulare e fungere proprio da "impalcatura" per le colture cellulari.

#### *5.1.1 Ruolo e funzione*

Il ruolo principale degli scaffold piezoelettrici è di agire da sistemi sensibili di trasduzione meccano-elettrica; pertanto, vengono convenientemente applicati alle regioni in cui i carichi meccanici sono predominanti [24]. Il movimento del corpo e la conseguente generazione di bioelettricità hanno recentemente suscitato un notevole interesse tra i ricercatori. Infatti, l'impalcatura piezoelettrica riesce ad assorbire il carico fisiologico e permettere lo sviluppo di una differenza di potenziale elettrico, che interagisce con i canali voltaggio-dipendenti del calcio, stimolando determinate vie di segnalazione: l'aumento intracellulare di ioni calcio attiva la calmodulina, poi la calcineurina, la quale porta alla defosforilazione dell'NF-AT, necessaria per regolare l'espressione dei fattori di crescita e la trascrizione genica (Figura 5.1) [22], [32]. Rispetto alle usuali soluzioni di ingegneria tissutale basate sull'elettroterapia, l'utilizzo dei materiali piezoelettrici permette la generazione di un campo elettrico fisiologico. La migliore procedura concepibile è l'impianto dello scaffold piezoelettrico nel sito danneggiato e questo, non richiedendo l'associazione di altri fattori come farmaci o biomolecole, rappresenta una valida alternativa alle terapie non convenzionali per la riparazione e la rigenerazione della cartilagine.

Nel complesso, le strategie dell'ingegneria del tessuto osteocondrale basate su scaffold che sono state sviluppate finora possono essere suddivise principalmente in quattro categorie principali:

scaffold monofasici o monofase, in cui lo stesso materiale omogeneo viene utilizzato per replicare sia gli strati della cartilagine articolare, sia dell'osso subcondrale; scaffold bifasici, i più diffusi, in cui vengono utilizzati due diversi biomateriali per ricreare le fasi cartilaginea e ossea; scaffold multifasici, in cui vengono aggiunti ulteriori strati di biomateriale per replicare più accuratamente la fase di transizione tra i due strati del tessuto osteocondrale e differenziare meglio le diverse regioni; scaffold a gradiente, in cui viene introdotto un gradiente continuo, anziché discreto, al fine di imitare uno o più dei diversi gradienti che si trovano nel tessuto nativo (come il gradiente meccanico e biochimico) [35].



**Figura 5.1** Rappresentazione del meccanismo di stimolazione per la rigenerazione cartilaginea con l'uso di uno scaffold piezoelettrico, che stimola i canali del calcio voltaggio-dipendenti con conseguente differenziazione e proliferazione cellulare [32]

### 5.1.2 Configurazioni

Esistono diverse tipologie di supporti cellulari che possono essere utilizzati, tra cui fogli cellulari, organoidi, aggregati cellulari o sferoidi, filamenti di tessuto e fibre. Sono state sviluppate anche microsfeere contenenti cellule condrogeniche, tra cui condrociti e cellule mesenchimali staminali, per la rigenerazione della cartilagine articolare [27].

Per l'applicazione clinica, la configurazione strutturale dello scaffold è un fattore rilevante perché essa definisce la forma che prenderà il tessuto neoformato. Nella realtà i tessuti umani

si sviluppano tridimensionalmente, perciò l'obiettivo è quello di imitare il più possibile la configurazione strutturale del tessuto nativo, assicurando anche le stesse funzioni e proprietà. Le configurazioni esistenti sono descritte di seguito.

### *Scaffold tridimensionali*

Gli scaffold tridimensionali sono molto richiesti nell'ingegneria tissutale perché facilitano sia l'adesione cellulare che la successiva formazione di tessuto in vitro e in vivo. Nel caso specifico della cartilagine, la struttura tridimensionale aiuta a prevenire la dedifferenziazione dei condrociti che spesso si verifica nel caso di colture in supporti bidimensionali. Sono state sviluppate varie tecniche per fabbricare impalcature tridimensionali con un'elevata porosità e un'ampia area superficiale. Inoltre questi tipi di scaffold possono fungere da vettori per il rilascio dei fattori di crescita in una maniera controllata e possono indurre la condrogenesi delle cellule fino a quando non sono completamente degradati. La porosità è perciò un aspetto molto importante: la grandezza dei pori, infatti, influenza la migrazione cellulare e la diffusione di nutrienti. Un altro vantaggio della struttura porosa tridimensionale è quello di poter permettere l'integrazione dell'impianto con il tessuto circostante, contribuendo ad una maggiore stabilità meccanica all'interfaccia. La porosità e la permeabilità hanno inoltre un grande effetto sulla proliferazione dei condrociti e si stima che la grandezza dei pori ottimale sia tra 100 e i 500 micron [45].

### *Idrogel*

Gli idrogel, grazie alla loro biocompatibilità, si segnalano per l'uso come supporto per la crescita di cellule in ingegneria tissutale: una volta iniettati, riescono a formare strutture tridimensionali nel sito danneggiato [14], [46]. In essi, i condrociti non vengono attaccati alla superficie dello scaffold, ma vengono incapsulati in quanto è necessario mantenere il fenotipo condrogenico, evitando la dedifferenziazione. In particolare, i gel polielettrolitici possono assorbire enormi quantità d'acqua e rigonfiarsi. Presentano un comportamento insolito nella loro reazione agli stimoli ambientali: ad esempio, l'induzione di una contrazione meccanica produce una risposta elettrica, a differenza degli idrogel classici che non mostrano alcuna alterazione dell'equilibrio di rigonfiamento al variare dell'ambiente circostante. I polielettroliti, come i polisaccaridi e le proteine filamentose cariche, appaiono promettenti come sistemi modello per i tessuti biologici, consentendo loro di fungere da biomateriali per riparare i danni subiti [42]. Sono vantaggiosi nella medicina rigenerativa, in quanto essi possono incorporare cellule MSCs o condrociti e possono essere facilmente iniettati nell'area del difetto [46]. Sono

inoltre caratterizzati da funzioni quali il sostegno dell'adesione cellulare, la regolazione chimica, l'integrità strutturale, la biodegradabilità e la biocompatibilità.

Gli idrogel hanno un ruolo diretto sulla differenziazione condrogenica cellulare, grazie alle proprietà di porosità, rigidità e viscoelasticità. Parametri meccanici negli idrogel sono la rigidità, che mostra la capacità di resistere alla deformazione in risposta alla forza applicata, caratteristica fondamentale per la rigenerazione della cartilagine del ginocchio che è costantemente sotto carico, e la viscoelasticità, cioè la capacità di esibire comportamento sia elastico sia viscoso dopo l'applicazione della forza [46].

La funzionalizzazione dell'idrogel è un altro aspetto importante per guidare e migliorare la differenziazione condrogenica delle cellule staminali. Uno tra gli svantaggi che occorre tenere in considerazione è che i fattori di crescita diffondono rapidamente, disperdendosi e non riuscendo così a stimolare le cellule.

Per facilitare la differenziazione cellulare e il trasferimento dei nutrienti, recentemente l'uso di microsferiche di idrogel ha aperto una nuova frontiera, come riportato dalle sperimentazioni condotte da Xing et al. [46].

Nella speranza di una traduzione a livello clinico, in generale, l'inclusione di MSCs in idrogel rappresenta un approccio interessante per il trattamento dei difetti della cartilagine mediante iniezione [42].

### *Scaffold nanostrutturati*

Essendo il tessuto cartilagineo organizzato secondo una struttura nanometrica, è evidente che la migliore soluzione per stimolare la crescita di condrociti e guidare la rigenerazione del tessuto è l'utilizzo di materiali con nanostrutturati. Matrici con pori dell'ordine dei nanometri possono essere fabbricate mediante elettrofilatura, lisciviazione del particolato, incisione chimica e separazione di fase [6]. Nelle applicazioni della cartilagine, è stata posta molta attenzione per gli scaffold nanostrutturati fabbricati attraverso l'elettrofilatura.

#### *5.1.3 Tecniche di produzione*

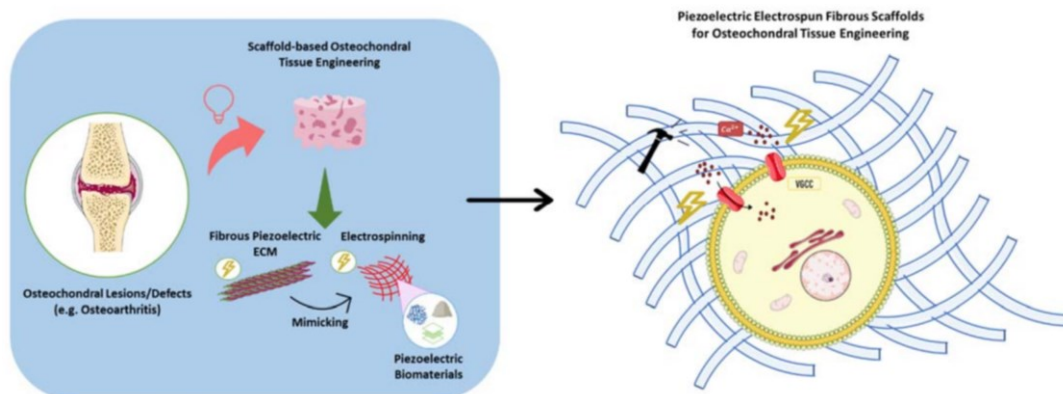
Per strutturare i materiali piezoelettrici su scala nanometrica vengono utilizzati due approcci principali: i metodi top-down e bottom-up. Sebbene i metodi top-down, possano garantire un ragionevole controllo sulle dimensioni e sulla posizione della struttura, essi portano spesso a un'elevata concentrazione di difetti, che riducono il coefficiente piezoelettrico delle strutture finali [34]. Diversamente, l'approccio bottom-up, noto anche come bioassemblaggio (bioassembling) e più comunemente diffuso per la rigenerazione della cartilagine, può portare

a strutture piezoelettriche di dimensioni più ridotte e con una minor densità di difetti [27]. Anche altri metodi bottom-up, come il processo sol-gel, si sono dimostrati efficaci per ottenere nanoparticelle piezoelettriche. Tutti questi metodi sono stati utilizzati indistintamente per strutturare materiali piezoelettrici con una struttura di perovskite, come il BaTiO<sub>3</sub>. Recentemente, il perfezionamento delle tecniche di fabbricazione ha permesso di aumentare i coefficienti piezoelettrici dei nanomateriali mediante la polarizzazione dei materiali [34].

### *Elettrofilatura*

L'elettrofilatura (electrospinning), una tecnica di tipo top-down, è il metodo più efficace per sviluppare scaffold con piezoelettricità e allo stesso tempo per imitare la rete fibrosa dell'ECM in un unico processo [26]. È una tecnica che consente la produzione di fibre polimeriche mediante l'utilizzo di una forza elettrostatica. A differenza delle convenzionali tecniche di filatura, capaci di realizzare fibre con diametro dell'ordine dei micron, l'elettrospinning è in grado di produrre fibre di dimensioni nanometriche.

L'elettrofilatura viene applicata per sviluppare scaffold fibrosi per strategie dell'ingegneria tissutale osteocondrale (Osteochondral Tissue Engineering, OCTE) al fine di replicare l'ECM del tessuto osteocondrale (Osteochondral Tissue, OCT), caratterizzata da un'alta percentuale di fibre di collagene nella sua composizione (in particolare, fibre di collagene di tipo II nella regione della cartilagine articolare, fibre di collagene di tipo I negli strati ossei) [35]. La combinazione della tecnica di elettrofilatura con biomateriali piezoelettrici ha il potenziale per produrre bioscaffold avanzati in grado di imitare le proprietà piezoelettriche strutturali dell'ECM del tessuto osteocondrale nativo e di essere utilizzati come piattaforme fisiologicamente rilevanti per la stimolazione elettrica o meccanica delle cellule, con l'obiettivo di migliorare la loro differenziazione verso linee correlate all'OCT in vitro e migliorare la rigenerazione dell'OCT in vivo (Figura 5.2) [35].



**Figura 5.2** Scaffold piezoelettrico, elettrofilato, fibroso per applicazioni nell'ingegneria tissutale osteocondrale [35]

L'attrezzatura per l'elettrospinning è composta da quattro componenti: uno spinner a forma di siringa con ago metallico, una pompa collegata al pistone della siringa, un alimentatore ad alta tensione e un collettore metallico fisso o mobile con messa a terra. Il processo di produzione prevede inizialmente che il polimero liquido (nella forma di fuso o in soluzione) all'interno della siringa sia alimentato grazie alla pressione generata dalla pompa. Applicando poi una differenza di potenziale tra lo spinner e il collettore si crea un campo elettrico, la cui intensità riesce a superare la tensione superficiale della goccia presente sull'estremità dell'ago, finché la repulsione elettrostatica creata non produce un getto carico continuo. La soluzione polimerica, quindi, risulta sottoposta ad un campo elettrico che provoca la comparsa di cariche elettriche sulla sua superficie, con la creazione di una forza elettrica repulsiva, opposta alla tensione superficiale. Il filamento subisce un movimento curvilineo caotico fino a depositarsi sul collettore. Per variare il diametro e la disposizione delle fibre, si possono aggiustare alcuni parametri, quali il potenziale elettrico, la concentrazione del polimero, la distanza ago-collettore e il movimento del collettore. A seconda della natura del liquido polimerico esistono due varianti di questa tecnica. Nell'elettrofilatura in soluzione il polimero è disciolto in un solvente che evapora a contatto con l'aria prima di colpire il collettore; il solvente permette di abbassare la tensione superficiale dei materiali polimerici, ottenendo una migliore filatura della fibra e provocando un movimento caotico del filamento e un suo posizionamento casuale. È possibile, inoltre, funzionalizzare le fibre incorporando molecole bioattive; i fattori di crescita, incapsulati in nanoparticelle per preservarne la bioattività, possono essere incorporati nelle matrici polimeriche. Tuttavia, i solventi organici hanno lo svantaggio di causare una potenziale tossicità: per questo motivo è stata introdotta l'elettrofilatura a fusione, che fa uso di un polimero allo stato fuso che solidifica prima di essere depositato sul collettore. In questo caso, a causa dell'assenza del solvente, la tecnica risulta più biocompatibile e si ottiene una disposizione più regolare delle fibre e un migliore legame tra gli strati. Tuttavia, si ottengono fibre con un diametro maggiore a causa dello stato fuso del polimero, accompagnato da un aumento della tensione superficiale.

In generale, le tecniche di elettrospinning consentono la realizzazione di strutture altamente porose che imitano l'ECM e hanno rugosità superficiale adatta all'adesione cellulare. Con questa tecnica si producono scaffold nanofibrosi altamente porosi con una grande varietà di materiali polimerici, come il PLLA, ma anche scaffold di materiali compositi [47]. L'architettura dei costrutti elettrofilati è favorevole all'adesione e alla proliferazione cellulare e permette il passaggio di nutrienti utili alla vitalità del tessuto. La possibilità di funzionalizzare

e modificare le fibre ottenute, di incorporare direttamente nella soluzione polimerica biomolecole o nanomateriali, e di generare strutture gerarchiche, rende la tecnica dell'electrospinning molto versatile e altamente indicata per l'ingegneria tessutale. Inoltre, in virtù del piccolo diametro delle fibre ottenute, l'elettrofilatura consente anche la fabbricazione di scaffold con elevati rapporti superficie-volume, funzionalità superficiali versatili e proprietà meccaniche migliorate. Queste proprietà combinate rendono l'elettrofilatura una strategia promettente per la produzione di scaffold per applicazioni OCTE. È stato anche scoperto che l'elettrofilatura influenza positivamente la piezoelettricità dei polimeri piezoelettrici, applicando simultaneamente un elevato campo elettrico alla soluzione polimerica (tecnica chiamata "polarizzazione") e attraverso lo stiramento meccanico e l'assottigliamento della struttura polimerica [35].

### *Stampa 3D*

La produzione additiva, comunemente indicata come stampa 3D, è associata allo sviluppo di una struttura tridimensionale attraverso la deposizione strato per strato di substrati di polvere, liquidi o materiali solidi, in un processo guidato da modelli CAD (Computer-Aided Design) precedentemente sviluppati che vengono replicati dalla stampante 3D. Questa versatile tecnica di fabbricazione origina scaffold con una buona risoluzione spaziale e strutture 3D complesse in modo rapido e riproducibile. Il bioprinting è un'altra tecnica di fabbricazione 3D in cui i bioinchiostri, contenenti biomateriali e cellule e, in alcuni casi, molecole bioattive, vengono utilizzati per produrre sostituti tissutali utilizzando un preciso sistema di controllo spaziale.

Sia la stampa 3D che il bioprinting sono state ampiamente utilizzate per fabbricare scaffold OCTE grazie alla loro capacità di replicare più fedelmente la struttura eterogenea e complessa dell'OCT rispetto alla tecnica precedentemente menzionata, insieme al maggiore controllo sulle caratteristiche principali degli scaffold. Tuttavia, va sottolineato che queste strategie promettenti presentano alcune limitazioni, come alcune restrizioni sulla forma dell'impalcatura (a causa di problemi tecnici di stampa) e citotossicità del materiale, nonché una ridotta vitalità cellulare nei processi di bioprinting [35].

#### *5.1.4 Caratterizzazione meccanica, chimica e biologica*

Nell'ambito dell'ingegneria dei biomateriali, l'obiettivo principe è quello di produrre scaffold che consentano un rapido processo di rigenerazione e forniscano una protezione antimicrobica di lunga durata nel sito della lesione [39]. Si punta perciò a realizzare un supporto temporaneo che degrada nel tempo con una velocità controllata, lasciando il posto al tessuto di nuova



formazione. I prodotti di degradazione, però, non devono essere tossici e devono poter essere facilmente eliminati dall'organismo tramite i naturali processi metabolici.

Considerando l'interazione dei biomateriali con l'organismo, si ha che ogni materiale impiantato provoca una reazione nell'organismo e, allo stesso tempo, subisce l'attacco da parte dell'organismo. Infatti, nessun materiale è del tutto inerte in ambiente biologico [2].

Uno scaffold ideale per l'ingegneria tissutale dovrebbe soddisfare i seguenti requisiti:

- essere biocompatibile, cioè stabilire interazioni non sfavorevoli con il tessuto ospite;
- non essere biotossico, cioè minimizzare la reazione avversa da parte del tessuto;
- essere bioattivo, cioè favorire interazioni dirette di tipo biochimico con il tessuto;
- essere biorisorbibile, cioè subire una degradazione controllata e progressiva senza rilasciare prodotti tossici o causare reazioni di rigetto;
- possedere una porosità adeguata che permetta la diffusione di nutrienti e rifiuti metabolici e l'interconnessione tra i pori;
- permettere la proliferazione e la differenziazione delle cellule, così come la formazione della matrice extracellulare;
- fungere da sostegno meccanico, possedendo proprietà meccaniche sufficienti a sopportare la crescita di nuovo tessuto sotto il carico a cui è naturalmente sottoposto;
- essere in grado di fissarsi e di integrarsi con il tessuto circostante.

A livello meccanico importante risulta la stabilità del materiale impiantato: l'impalcatura deve possedere una resistenza tale da fornire un supporto fisico simile al tessuto reale per una durata prolungata [29]. Anche il controllo del tasso di degradazione è fondamentale per il successo della rigenerazione. Idealmente, il tasso di degradazione del materiale dovrebbe corrispondere al tasso di rigenerazione del tessuto: lo scaffold dovrebbe rimanere intatto per il tempo necessario a garantire alle cellule di secernere la matrice extracellulare e di formare un supporto in grado di sostenere le sollecitazioni in vivo [31].

Le cellule richiedono un supporto strutturale: le proprietà biomeccaniche possono influenzare la sopravvivenza cellulare, la differenziazione e quindi il potenziale rigenerativo. Infatti, le proprietà meccaniche degli scaffold per il tessuto osteocondrale sono fondamentali data la necessità di sostenere le cellule e l'ECM neoformata e di resistere alle forze costantemente applicate al tessuto cartilagineo. La resistenza meccanica dipende soprattutto dai parametri operativi utilizzati durante l'elettrofilatura e dalle proprietà meccaniche intrinseche dei materiali [35].

La principale limitazione che impedisce un diffuso uso degli scaffold piezoelettrici nelle applicazioni OCTE è la non biodegradabilità della maggior parte dei biomateriali piezoelettrici,

tra cui molte piezoceramiche. Anche se sono disponibili polimeri piezoelettrici biodegradabili, tra cui PLLA e PHB, essi presentano scarse proprietà meccaniche e, soprattutto, coefficienti piezoelettrici ridotti. Sebbene la biodegradabilità sia considerata una caratteristica importante per gli scaffold, in quanto consente al materiale di degradarsi gradualmente, lasciando spazio ai tessuti di nuova formazione, si trovano argomenti a favore nell'uso di materiali non biodegradabili per la rigenerazione di tessuti portanti con lunghi tempi di recupero o incapaci di una riparazione completa. Infatti, i polimeri non biodegradabili possono sostenere la crescita dei tessuti per lunghi periodi, mentre le loro caratteristiche meccaniche e biologiche rimangono perlopiù intatte, a differenza dei materiali biodegradabili, che perdono gradualmente le loro proprietà progettate e quindi diventano incapaci di supportare adeguatamente la formazione di neo-tessuti. Tuttavia, l'uso di questi materiali per OCTE non può essere considerato, soprattutto in ragione del fatto che questi scaffold dovrebbero molto probabilmente essere rimossi dopo un determinato periodo per evitare effetti avversi sulla salute, richiedendo un'ulteriore procedura chirurgica [35].

La funzionalizzazione di materiali piezoelettrici su scala nanometrica con gruppi di biotargeting rappresenta una possibile soluzione per facilitare la traslazione dei materiali piezoelettrici ad applicazioni in vivo. Sfruttando il gruppo idrossile presente sulla superficie degli ossidi metallici piezoelettrici, è possibile ottenere un legame covalente utilizzando una reazione basata su un agente di accoppiamento: silani, fosfati, carbossilati e titanati sono agenti di accoppiamento comunemente utilizzati per modificare le superfici degli ossidi. Ad esempio, in questo contesto, il 3-glicidossipropil-trimetossisilano (GPTMS) e il  $\gamma$ -aminopropil-trimetossisilano ( $\gamma$ -APS) sono stati utilizzati per introdurre gruppi epossidici o amminici sulla superficie del titanato di bario. Reagenti come l'acido esilfosfonico (HPA) o l'acido pentafluorobenzilfosfonico (PFPA) sono stati utilizzati anche per modificare efficacemente la superficie delle nanoparticelle di bario-titanato (BTNPs) con gruppi acidi. È stato effettuato anche l'avvolgimento non covalente di polimeri sulle nanoparticelle piezoelettriche, utilizzando poli-L-lisina, glicole chitosano, gomma arabica e altre molecole biocompatibili, facilitando così l'internalizzazione delle nanoparticelle all'interno delle cellule bersaglio [34].

Anche l'idrofilicità è una proprietà importante degli scaffold: essa determina l'adesione, la proliferazione e la differenziazione cellulare in vitro e la crescita dei tessuti in vivo, aspetti garantiti anche grazie alla rugosità superficiale, alla bagnabilità e alla tensione superficiale [31], [39].

La comprensione delle interazioni cellula-substrato è fondamentale per giudicare la reazione biologica causata dai biomateriali impiantati. Dal punto di vista delle cellule, le proteine

rivestono i biomateriali prima che si verifichi l'adesione cellulare. Pertanto, la biocompatibilità e, di conseguenza, il successo degli impianti dipendono dalle interazioni tra le proteine e i materiali piezoelettrici. Questa prima fase è decisiva perché precede l'adesione delle cellule e la conseguente crescita dei tessuti [42].

Dopo aver ricevuto una stimolazione elettrica attraverso i materiali piezoelettrici, la risposta delle proteine e delle cellule è un aspetto che influisce sulla rigenerazione dei tessuti. Dunque, l'adsorbimento delle proteine è il primo passo nell'interazione tra cellule e biomateriali e svolge un ruolo chiave nella trasduzione del segnale biologico. L'integrazione tra tessuto e materiale innestato è strettamente correlata alle proprietà superficiali dello scaffold. L'adsorbimento delle proteine porta all'adesione, alla crescita e alla differenziazione delle cellule. Tuttavia, è stato riscontrato che l'adsorbimento delle proteine sullo scaffold è aspecifico. Non è sbagliato affermare che il successo dell'impianto dipende in gran parte dall'interfaccia tra proteine e scaffold. Pertanto, l'adattamento delle proprietà superficiali dello scaffold è fondamentale per modulare la quantità, la densità e la conformazione delle proteine adsorbite sulla sua superficie [32].

## **5.2 Cellule**

Le cellule utilizzate nell'ingegneria del tessuto cartilagineo includono cellule presenti nel tessuto ospite, come i condrociti, e cellule staminali. Queste due tipologie di cellule vengono studiate per la loro propensione a sintetizzare proteoglicani e collagene di tipo II.

### *5.2.1 Condrociti*

I condrociti sono l'unico tipo di cellula nella cartilagine articolare. I condrociti autologhi sono l'unica fonte cellulare per la riparazione della cartilagine articolare e quindi vengono ampiamente utilizzati in questo ambito pur presentando alcune limitazioni. Ad esempio, la disponibilità autologa dei condrociti è limitata e non può soddisfare l'elevata domanda cellulare di riparazione della cartilagine articolare. Sebbene siano stati adottati metodi di espansione cellulare in vitro, come quelli utilizzati nell'ACI, per aumentare il numero di cellule per il trapianto, i condrociti possono dedifferenziarsi durante la coltura in vitro, causando una diminuzione di sintesi di proteoglicani e di collagene di tipo II e, contemporaneamente, un aumento di collagene di tipo I. Anche altre fonti alternative di condrociti prontamente disponibili, come i condrociti allogenicici o xenogenicici, sono state ampiamente studiate. Tuttavia, questi condrociti possono potenzialmente indurre risposte immunitarie e trasmettere malattie.

Pertanto, il campo dell'approvvigionamento allogenico e xenogenico dei condrociti richiede ulteriori indagini per attenuare tali preoccupazioni [6].

Anche se la ricerca ha fatto progressi incoraggianti e un prodotto che utilizza sferoidi di condrociti autologhi è stato autorizzato per riparare i difetti della cartilagine articolare, due questioni critiche devono ancora essere risolte. La prima è rappresentata dal fatto che i condrociti tendono a perdere il loro fenotipo nativo, trasformandosi in cellule simili ai fibroblasti. La sfida di preservare il fenotipo nativo dei condrociti nell'ingegneria dei tessuti cartilaginei è ancora aperta. La morfologia nativa della tipica cartilagine articolare difficilmente si può formare in vitro con qualsiasi tipo di tecnica produttiva. Nelle microsfele polimeriche cariche di cellule, poiché la degradazione dei polimeri avviene in vivo, è possibile osservare un tessuto simile alla cartilagine solo in alcune aree del macrotessuto assemblato, dopo che i polimeri si sono degradati e i neo-tessuti sono stati rimodellati. La morfologia simile a quella nativa non può formarsi nemmeno nelle singole microsfele.

La seconda questione è legata alla difficoltà di ottenere la completa integrazione dei blocchi di costruzione della microcartilagine nella cartilagine ospite. Per esempio, alcune indagini sperimentali hanno rivelato che gli sferoidi cellulari sono stati in grado di fondersi solo in un tessuto cartilagineo piccolo e sottile (<1.5 mm sull'asse lungo, <0.75 mm in altezza); quando si assembla un tessuto macro-cartilagineo più grande (>5 mm di diametro), i confini dei singoli moduli rimangono, si formano nuclei necrotici e le proprietà meccaniche dei tessuti sono scarse [27].

### *5.2.2 Cellule staminali*

A causa delle limitazioni relative all'uso dei condrociti, sono state studiate fonti cellulari alternative al fine di trovare soluzioni cellulari caratterizzate da una facile accessibilità, grande disponibilità e capacità di differenziazione condrogenica. Queste cellule staminali del mesenchima possiedono la capacità di proliferare in gran numero senza perdere il proprio fenotipo. A differenza degli allotrapianti, un aspetto rilevante a favore dell'utilizzo delle cellule staminali è che esse non inducono una risposta immunogenica. Inoltre, si prelevano dal paziente con un intervento semplice, non invasivo.

Le cellule staminali del tessuto adiposo hanno assunto grande importanza soprattutto per l'abbondanza e la facilità con cui possono essere procurate, nonostante esse abbiano dimostrato in vitro un minor potenziale condrogenico [6]. A livello funzionale, esse presentano due proprietà uniche: le capacità di auto-rinnovamento, cioè la possibilità di generare numerose cellule discendenti identiche alle cellule madri, e la potente capacità di differenziarsi in più tipi

di cellule specializzate [21]. L'età del paziente influisce sulla capacità di proliferazione delle proprie cellule staminali.

Due tipi di cellule staminali, cioè le cellule staminali mesenchimali adulte (MSCs) e le cellule staminali embrionali (ESCs), sono emerse come fonti cellulari promettenti per l'ingegneria del tessuto cartilagineo articolare.

Le cellule staminali mesenchimali provenienti da una varietà di tessuti umani tra cui midollo osseo, grasso, sinovia, periostio, muscolo scheletrico, pelle, sono state ampiamente studiate nella medicina rigenerativa per la riparazione di difetti cartilaginei piccoli e grandi. Le MSCs derivate dalla membrana sinoviale stanno attirando una notevole attenzione, poiché apparentemente hanno un grande potenziale condrogenico [21]. Le MSCs autologhe hanno una capacità proliferativa abbastanza elevata, riuscendo a generare molte cellule senza perdere il loro fenotipo, e non inducono risposte immunitarie. Inoltre, possono essere facilmente isolate e prelevate da molti tessuti mesenchimali (in particolare la procedura risulta minimamente invasiva nel caso di tessuti adiposi e cutanei), riducendo la morbilità del sito donatore e il dolore del paziente rispetto alle terapie di autotrapianto e ACI. Molti metodi sono stati studiati per indurre la condrogenesi delle MSCs, contrassegnata dalla produzione di GAGs e collagene di tipo II. Sono stati studiati e confrontati anche i potenziali condrogenici delle MSCs provenienti da diversi tessuti: le MSCs del midollo osseo sono le più popolari, considerando che sono raccolte facilmente dalla cresta iliaca e hanno un buon potenziale condrogenico. Molti studi [21] in vitro e in vivo hanno rivelato risultati promettenti di MSCs derivate dal midollo combinate con vari biomateriali o fattori di crescita per riparare i difetti della cartilagine. Uno studio [21] ha dimostrato che le MSCs derivate dalla sinovia proliferano più velocemente delle MSCs derivate dal midollo osseo quando coltivate nel siero umano autologo, fungendo così da fonte cellulare aggiuntiva per la rigenerazione della cartilagine. Sebbene studi in vitro abbiano dimostrato che le cellule staminali derivate dal tessuto adiposo (Adipose-Derived Stem Cells, ADSCs) possono avere un potenziale condrogenico inferiore rispetto alle MSCs derivate dal midollo osseo, le ADSCs attirano ancora una crescente attenzione per l'ingegneria del tessuto cartilagineo in virtù della loro abbondanza e della facilità di approvvigionamento. Inoltre, l'acquisizione minimamente invasiva di ADSCs dal tessuto sottocutaneo elude la morbilità e il dolore del sito donatore.

Sulla base dei risultati degli studi preclinici e clinici [21], il trapianto di MSCs mostra un'enorme promessa per promuovere la riparazione e la rigenerazione della cartilagine articolare. In più, è necessario pensare queste cellule associate ai supporti piezoelettrici: la loro combinazione può davvero rivoluzionare e innovare l'idea di rigenerazione tissutale. Pertanto, assieme agli studi

sui materiali piezoelettrici, sono necessari ulteriori ricerche per ottimizzare le condizioni di coltura delle MSCs, comprendere i meccanismi di differenziazione condrogenica sottostanti, rigenerare le cartilagini biomimetiche basate su MSCs ed esplorare terapie per una rigenerazione della cartilagine umana di successo [6].

Le cellule staminali embrionali (Embryonic Stem Cells, ESCs) hanno una capacità di proliferazione quasi illimitata e si possono differenziare in qualsiasi tipo di cellula somatica; queste caratteristiche le rendono una soluzione promettente per la rigenerazione dei tessuti. Vista la loro vasta proliferazione, in questo caso, risulta difficoltoso indurre la condrogenesi, cioè una specifica via di differenziazione: per questo si cercano i fattori di crescita e le condizioni di coltura ideali per stimolare la condrogenesi. Una delle problematiche riscontrate negli studi è la tendenza all'ipertrofia e alla calcificazione dei condrociti derivanti dalla coltura in vitro. È inoltre possibile che dalla differenziazione delle ESCs si formino più tessuti in quanto non è possibile controllare la differenziazione cellulare, con conseguente formazione di teratomi. Non si conosce ancora il metodo migliore per differenziare selettivamente le ESCs in linee cellulari desiderabili nei siti di lesione per rigenerare i tessuti: poiché la ricerca sulle ESCs è ancora agli inizi, sono necessari ulteriori studi in merito all'applicazione di questo tipo di cellule, che deve anche considerare le questioni etiche [6].

Un altro tipo di cellule sono quelle derivanti dal sangue del cordone ombelicale (Umbilical Cord Blood, UBC), una ricca fonte di cellule staminali progenitrici ematopoietiche. Esse hanno dimostrato in vitro di avere un potenziale condrogenico maggiore rispetto alle MSCs [21].

### **5.3 Fattori stimolanti esterni**

Nel caso dell'applicazione di materiali piezoelettrici, per ottenere il massimo rendimento della capacità degli stessi di trasformare uno stimolo meccanico in elettrico, risulta efficace la stimolazione con gli ultrasuoni attraverso un dispositivo esterno.

#### *5.3.1 Ultrasuoni*

Gli ultrasuoni (US) sono onde meccaniche longitudinali che, oltre al carico meccanico fisiologico, possono essere sfruttate per potenziare l'attività piezoelettrica dei materiali usati per la rigenerazione [39].

Le nanoparticelle piezoelettriche attivate da ultrasuoni esterni costituiscono un paradigma che consente l'induzione di stimoli elettrici localizzati all'interno del corpo in modo wireless. Infatti, gli stimoli elettrici possono essere trasmessi su richiesta e con un'elevata precisione spaziale nel tessuto bersaglio utilizzando una fonte meccanica esterna, come un trasduttore US, e sfruttando

le proprietà piezoelettriche delle nanoparticelle esposte a tale stress meccanico. Gli US sono già ampiamente utilizzati in medicina sia per scopi diagnostici che terapeutici. Tuttavia, l'idea di combinarli attivando a distanza le particelle piezoelettriche con US esterni per produrre cariche elettriche in situ appartiene a un'area di ricerca recente. In questo scenario, le onde US vengono sfruttate per attivare meccanicamente le nanoparticelle, generando così cariche elettriche a distanza all'interno dei tessuti sfruttando l'effetto piezoelettrico diretto [34]. Perciò questo approccio rappresenta la possibilità di stimolazione elettrica senza fili attraverso una stimolazione meccanica: il segnale elettrico prodotto è simile a quello che si verifica nella matrice extracellulare naturale durante il processo di rimodellamento del tessuto cartilagineo [30], [35].

In particolare, per ottenere un tasso di rigenerazione migliore, i ricercatori studiano stimolazioni fisiche esterne del biomateriale dopo il suo impianto grazie all'uso di ultrasuoni pulsati a bassa intensità (Low-intensity Pulsed Ultrasound, LIPUS). Questo metodo si basa su una stimolazione esterna che, secondo studi di base e clinici, ha la capacità di migliorare il processo di guarigione ossea e cartilaginea promuovendo la proliferazione e la differenziazione delle MSCs [39].

L'interazione tra nanomateriali piezoelettrici e onde US può quindi essere sfruttata per attivare meccanicamente le nanoparticelle piezoelettriche. Tuttavia, la fisica alla base di questa interazione non è ancora del tutto chiara. A tal proposito, sono stati proposti solo alcuni tentativi di studio di modelli che descrivono l'interazione tra onde meccaniche e particelle piezoelettriche. In un modello analitico sviluppato da Marino et al., la tensione generata sulla superficie risulta linearmente proporzionale al raggio della particella sferica e alla pressione dell'onda US [34].

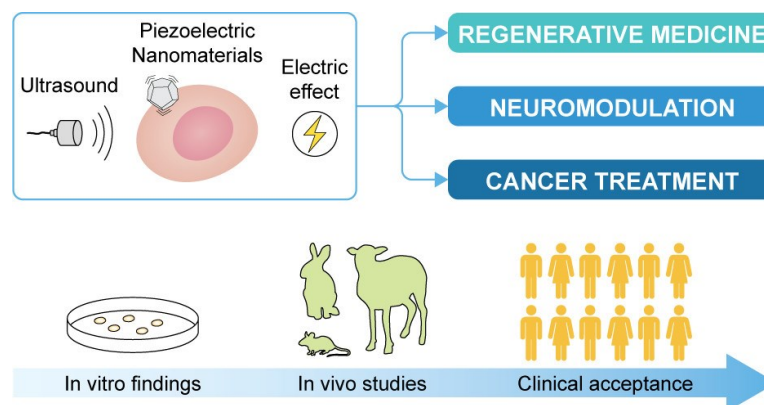
Nonostante la modalità di stimolazione LIPUS sia già stata approvata dalla Food and Drug Administration (FDA) per promuovere la guarigione delle fratture ossee, è necessaria una migliore comprensione dei meccanismi di interazione tra onde US, cellule e materiali piezoelettrici se si considera l'utilizzo in quest'ambito [48]. Sulla base di questi risultati, i ricercatori hanno immaginato di utilizzare l'approccio della stimolazione piezoelettrica con gli US senza l'utilizzo di una fonte di alimentazione esterna per trattare a distanza l'osteoporosi e l'osteoartrite e, più in generale, per promuovere la rigenerazione del sistema scheletrico [34].

Considerando gli ultimi grandi sviluppi tecnologici, questi biomateriali intelligenti possono consentire ai futuri pazienti di essere curati a casa, utilizzando un dispositivo simile a un tutore che genera stimoli meccanici per promuovere il processo rigenerativo dei tessuti danneggiati dell'OCT [35].

## CAPITOLO 6 Le sperimentazioni e il futuro utilizzo dei materiali piezoelettrici

Prima dell'approvazione per il commercio di qualsiasi dispositivo biomedicale destinato all'uomo, sono fondamentali le sperimentazioni che ne certifichino efficacia e sicurezza. A seguito di risultati promettenti in vitro e poi su modelli animali, i trials clinici permettono di arrivare all'approvazione per l'uso sull'uomo (Figura 6.1). Per quanto riguarda l'argomento trattato in questa tesi, ad oggi la ricerca è ancora molto attiva e le sperimentazioni si sono effettuate principalmente in laboratorio e, in alcuni casi, si è arrivati a testare i materiali su modelli animali.

Questo capitolo si concentrerà sull'illustrare brevemente le sperimentazioni eseguite sui materiali piezoelettrici e sul loro futuro utilizzo. Infine, si discuteranno le sfide attuali e future nell'uso dei materiali piezoelettrici, tra cui la necessità di migliorare la loro efficienza, la loro durata e la loro stabilità, così come la necessità di sviluppare nuove tecniche di produzione e di integrazione di questi materiali.



**Figura 6.1** Fasi della ricerca per l'approvazione all'utilizzo clinico: sperimentazioni in vitro, sperimentazioni in vivo, trials clinici [34].

### 6.1 Sperimentazioni in vitro

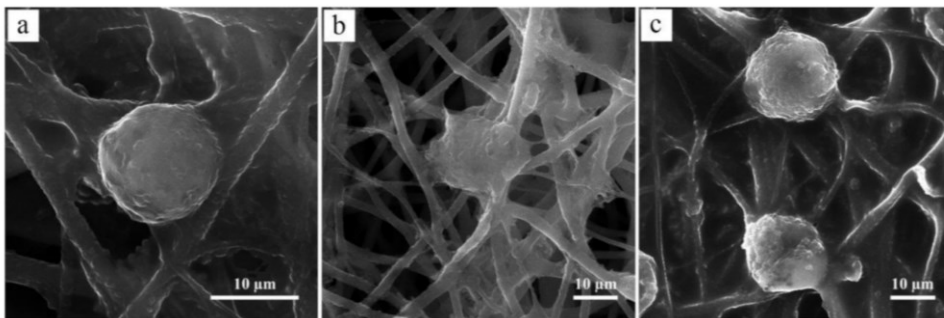
Per sfruttare appieno le proprietà dei materiali piezoelettrici e sviluppare nuove applicazioni per la rigenerazione cartilaginea sono necessarie sperimentazioni approfondite per comprendere le proprietà dei materiali, la loro risposta alle sollecitazioni meccaniche e le loro prestazioni in diverse condizioni di utilizzo. Fondamentale risulta la valutazione biologica di questi materiali per poter permettere il successivo passaggio della sperimentazione su un modello animale. Di seguito sono riportati gli studi di analisi delle proprietà biologiche, fisiche e meccaniche di scaffold di materiali piezoelettrici su cui sono state seminate delle cellule.



### *PHB+chitosano (+MWCNT+acido ialuronico)*

Studi sperimentali condotti da Sadeghi et al. hanno dimostrato che, grazie all'aggiunta di chitosano, le matrici elettrofilate di PHB hanno mostrato una migliore idrofilicità (l'angolo di contatto con l'acqua è passato da 74° a 67°) e biodegradabilità, oltre a una riduzione del modulo di Young (da 87 MPa a 31MPa) e della porosità [37]. Le fibre sono state seminate con condrociti isolati di coniglio per valutare l'adesione cellulare, che è risultata essere più efficace sulle matrici composite rispetto a quelle di PHB puro (Figura 6.2) [31], [35]. Non sono stati rilevati segni di infiammazione, permettendo la completa degradazione che ha portato a cambiamenti significativi di densità [29].

In un altro studio in vitro, le matrici porose di PHB-chitosano hanno dimostrato di supportare la differenziazione condrogenica delle MSCs di ratto [31]. La combinazione di questi due materiali ha assunto così tanta importanza che è stata applicata anche in uno studio in vivo.



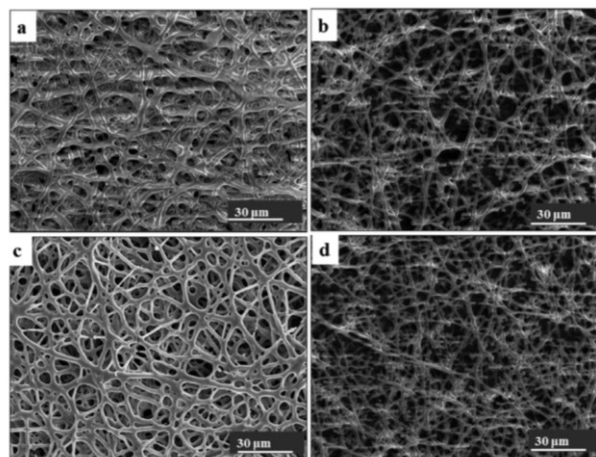
**Figura 6.2** Immagini al SEM di condrociti coltivati sulla superficie di scaffold di PHB (a), PHB-chitosano15% (b), PHB-chitosano20% (c) [31].

In un altro studio [35], a questo nanocomposito sono stati aggiunti anche i nanotubi di carbonio (CNTs), in particolare quelli caratterizzati da una parete multipla definiti MWCNTs (Multi-Walled Carbon NanoTubes), usati per migliorarne le proprietà meccaniche e per ridurre il tasso di degradazione [35]. Con l'aggiunta di questi composti di carbonio alla soluzione polimerica, il diametro delle fibre elettrofilate è diminuito e la porosità ha superato l'80%, fornendo un ambiente più adatto per l'interazione cellulare [49]. In termini di proprietà biologiche e strutturali, gli scaffold PHB-chitosano-MWCNT1% sono risultati i più adatti per l'ingegneria dei tessuti cartilaginei [29], [50]. L'aggiunta di acido ialuronico ha contribuito ad aumentare la bioattività e l'idrofilicità degli scaffold risultanti e a ridurre leggermente il loro modulo di Young e la loro porosità [51]. I condrociti sono stati in grado di aderire e proliferare sulla superficie di queste fibre bioattive, confermandone la biocompatibilità [35].

### *PHBV+BaTiO<sub>3</sub>*

In uno studio effettuato da Jacob et al. [36] è stata analizzata la struttura ibrida composta da nanofibre di PHBV e nanoparticelle di BaTiO<sub>3</sub> prodotta con la tecnica dell'elettrofilatura. Questa tecnica ha permesso di creare strutture con morfologia fibrosa simile alla cartilagine naturale: in base alle diverse quantità di PHBV e di BaTiO<sub>3</sub> si sono create strutture con differente diametro dei pori in modo da garantire la migrazione delle cellule e l'apporto di nutrienti (Figura 6.3) [36]. Gli scaffold prodotti sono stati poi seminati con condrociti derivanti da MSCs.

L'aumento della concentrazione di titanato di bario ha portato a un miglioramento delle proprietà meccaniche (aumento del modulo di Young) e a un aumento del coefficiente piezoelettrico [35]. Sono stati inoltre analizzati vari aspetti, come il processo di degradazione, nel quale si è visto che l'aggiunta di nanoparticelle di BaTiO<sub>3</sub> rallenta il processo di degradazione perché viene ridotta la permeabilità delle molecole d'acqua. In aggiunta, la polarizzazione degli scaffold ha dimostrato di poter aumentare la densità di carica superficiale e migliorare ulteriormente l'attività biologica delle cellule, in quanto l'allineamento dei dipoli aumenta l'idrofilicità delle matrici: gli scaffold polarizzati hanno promosso fortemente l'adesione cellulare, la proliferazione e l'espressione genica del collagene di tipo II, dimostrando una buona interazione cellula-materiale rispetto agli scaffold di controllo (PHBV puro) e agli scaffold non polarizzati [35], [36]. Pertanto, si conclude che l'aggiunta di elementi ceramici alla matrice polimerica e la stimolazione elettrica hanno determinato l'aumento della costante piezoelettrica e della densità di carica superficiale, promuovendo quindi la rigenerazione della cartilagine [30], [32].



**Figura 6.3** Immagini al SEM della morfologia fibrosa di PHBV puro (a), PHBV15%-BaTiO<sub>3</sub>5% (b), PHBV15%-BaTiO<sub>3</sub>15% (c), PHBV15%-BaTiO<sub>3</sub>20% (d) [36].

### *PHBV+OG*

Recentemente sono stati analizzati scaffold piezoelettrici e nanocompositi a base di PHBV e di ossido di grafene (OG), prodotti attraverso elettrofilatura, su cui sono stati seminati condrociti di origine ovina. Anche se il grafene puro non presenta proprietà piezoelettriche, ha trovato nuove applicazioni in ragione delle buone proprietà meccaniche e soprattutto dell'elevata conduttività elettrica: esso, se incorporato al PHBV, ha infatti mostrato di migliorare la piezoelettricità e la resistenza a trazione (Figura 6.4). In aggiunta, la maggiore idrofobicità del PHBV-OG e l'impaccamento delle catene polimeriche nei compositi rallentano la degradazione. Anche a livello biologico l'ossido di grafene ha mostrato molti vantaggi: esso, infatti, contiene gruppi idrossilici e carbossilici terminali, i quali contribuiscono ad aumentare l'idrofilicità del PHBV puro, ed è in grado di alterare le proprietà superficiali come la rugosità e la nanotopografia degli scaffold, promuovendo sia l'adesione e la proliferazione dei condrociti sia la produzione di ECM [38].



**Figura 6.4** Meccanismo coinvolto nella piezoelettricità indotta dall'aggiunta di OG [38].

### *PVDF+PCL*

In uno studio di Khorshidi et al. [35] sono stati valutati gli effetti della piezoelettricità e della pressione idrostatica sulla differenziazione condrogenica delle cellule staminali. Gli scaffold fibrosi analizzati erano costituiti dal piezoelettrico PVDF e dal policaprolattone (PCL), un polimero biodegradabile; il PCL è molto usato sia perché può essere lavorato con la tecnica dell'elettrospinning, una volta disciolto in cloroformio, sia perché la lenta degradazione non è tossica per l'organismo in quanto basata sull'idrolisi di legami esteri, un normale meccanismo che avviene nel corpo umano in condizioni fisiologiche.

Le fibre elettrofilate sono state poi seminate con MSCs derivate dal tessuto adiposo e sono state esposte regolarmente a pressione idrostatica (5 MPa a 0.5 Hz per un'ora) [35]. I risultati hanno mostrato che, oltre a migliorare la proliferazione e l'integrazione delle cellule, la piezoelettricità del PVDF ha promosso la produzione di GAGs. Mentre l'espressione del gene SOX9, un

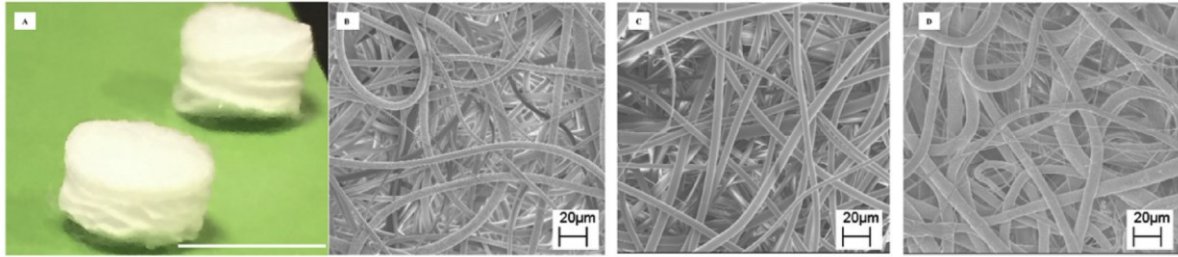
importante regolatore condrogenico, è stata influenzata positivamente sia dalla piezoelettricità sia dagli stimoli meccanici della pressione idrostatica, l'espressione del collagene di tipo II non è stata condizionata da questi due parametri.

Questi risultati confermano l'importanza della piezoelettricità sulla formazione dell'ECM cartilaginea, ma soprattutto suggeriscono una promettente possibilità nell'utilizzo di generatori idrostatici a pressione per indurre stimoli piezoelettrici in vitro per migliorare la rigenerazione della cartilagine [35].

### *PVDF-TrFE*

Damaraju et al. [28] hanno studiato l'effetto piezoelettrico dello scaffold tridimensionale fibroso di PVDF-TrFE sulla differenziazione di MSCs umane. Alcuni scaffold in PVDF-TrFE sono stati elettrofilati per aumentare il contenuto di cristalli in fase polare e aumentare quindi le proprietà piezoelettriche, mentre altri sono stati trattati termicamente con il processo di annealing; come controllo non piezoelettrico è stato usato il PCL (Figura 6.5). A seconda dell'applicazione, alcune proprietà degli scaffold quali la porosità, la dimensione e l'orientamento delle fibre, possono essere personalizzate modificando i parametri del processo di elettrofilatura e la concentrazione del polimero. In questo contesto, sono state ottenute fibre di dimensioni micrometriche con una spaziatura interfibra e una porosità tali da garantire l'infiltrazione cellulare. Le matrici risultanti sono state poi sottoposte a compressione dinamica, imponendo una deformazione del 10%, per simulare la deformazione fisiologica [28]. Si è scoperto che a basso voltaggio (20 mV/mm) le MSCs vanno incontro a condrogenesi, mentre ad alto voltaggio (1 V/mm) ad osteogenesi [38], [39]. Inoltre, lo stimolo elettromeccanico si è dimostrato più efficace nella promozione della differenziazione cellulare rispetto al solo carico meccanico.

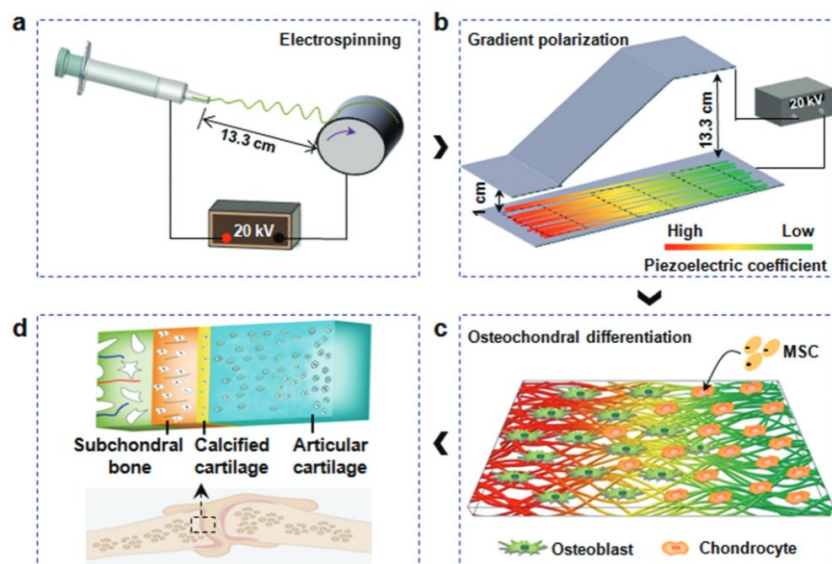
Considerando che questi scaffold sono pensati per esser posti su una sezione anatomica, la stimolazione elettrica può essere generata attraverso il movimento fisiologico: questa combinazione aumenta il livello di attività piezoelettrica dello scaffold, che ha dimostrato avere una stretta relazione con la differenziazione delle MSCs [28].



**Figura 6.5** Esempi di scaffold di PVDF-TrFE 3D con uno spessore di 3 mm (A), visti al SEM e composti da: PVDF-TrFE sottoposto a elettrospinning (B), PVDF-TrFE sottoposto ad annealing (C), PCL (D) [28].

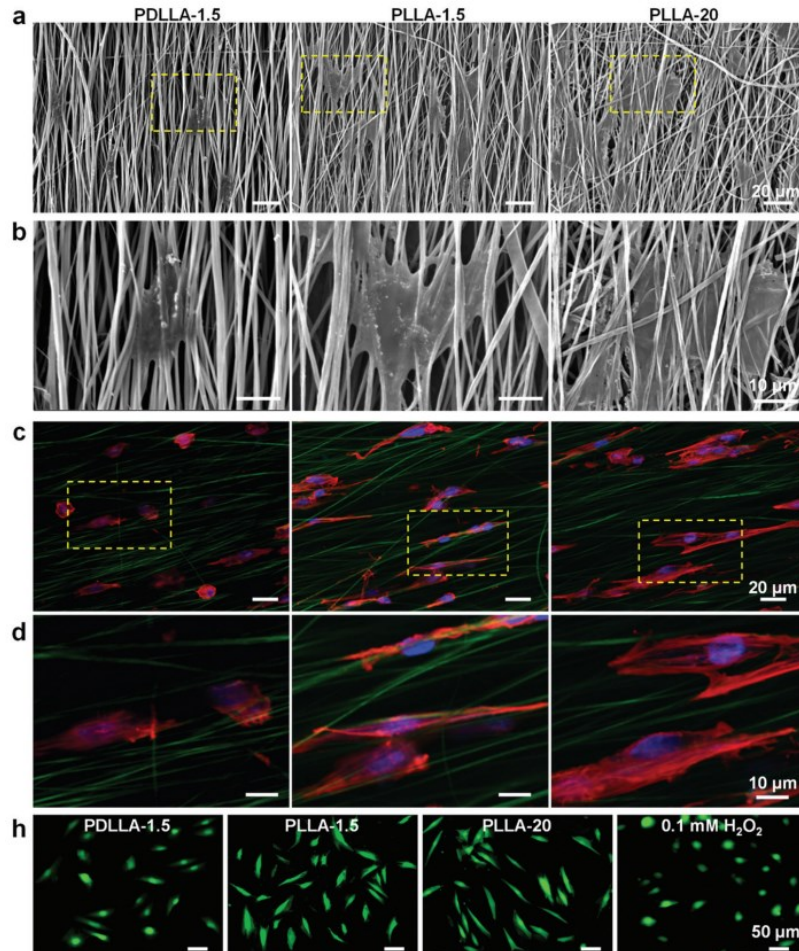
### PLLA

Il PLLA è stato studiato per indurre la differenziazione osteocondrale integrata delle MSCs di ratto. Sono state prodotte delle matrici fibrose, definite NFMs (nanofibrous mats) con la tecnica dell'elettrospinning, regolandone la piezoelettricità attraverso polarizzazione con un campo elettrico in corrente continua (DC): la variazione lineare del campo ha permesso di generare un gradiente di piezoelettricità. Le forze di contrazione derivanti dall'adesione cellulare sugli scaffold hanno permesso lo sviluppo di un potenziale piezoelettrico variabile. Questo fattore ha dimostrato che un'attività piezoelettrica elevata ha contribuito alla differenziazione in osteociti, mentre quella più bassa ha promosso la differenziazione in condrociti: in generale, la progressiva transizione piezoelettrica ha permesso un differenziamento graduale tra la regione dell'osso subcondrale fino a quella della cartilagine articolare (Figura 6.6) [26].



**Figura 6.6** Illustrazione schematica della differenziazione integrale osteocondrale nei piezoelettrici NFMs: elettrospinning (a), polarizzazione con un campo elettrico DC (b), semina delle MSCs e differenziazione selettiva in condrociti e osteociti(c), formazione di tessuto osteocondrale integrato in NFMs (d) [26].

Sui substrati piezoelettrici di PLLA si è analizzata la differenziazione delle MSCs, in particolare l'espressione dei due geni di origine cartilaginea (COL2 e SOX9), usando come controllo negativo matrici non piezoelettriche di PDLLA (Figura 6.7).



**Figura 6.7** Caratterizzazione delle MSCs in NFMs, composti da PDLLA-1.5, PLLA-1.5, PLLA-20: vista al SEM (a, b), al CLSM (c, d), al microscopio a fluorescenza dopo la cultura e l'incubazione con 0.1 mM di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (e) [26].

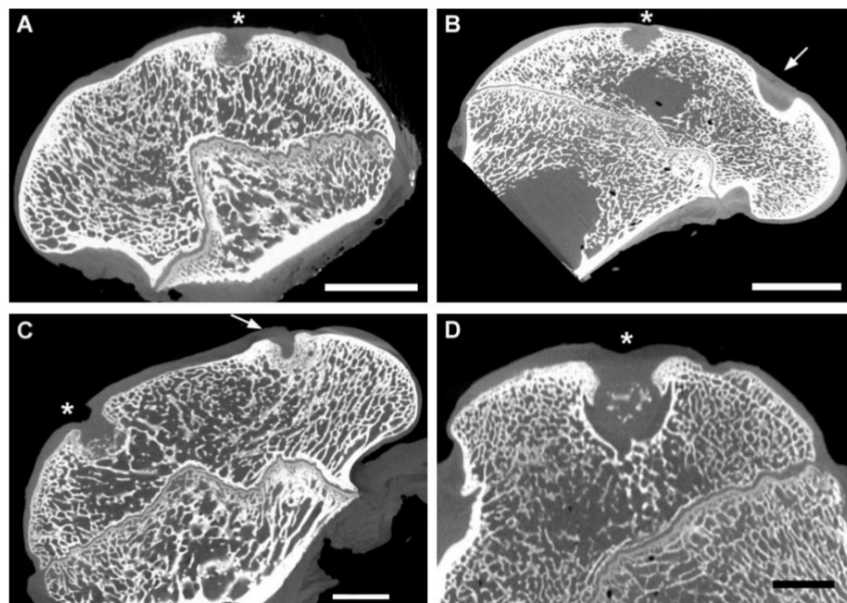
## 6.2 Sperimentazioni in vivo

Gli esperimenti in vivo su modelli animali rappresentano una fase fondamentale nella ricerca scientifica, in quanto permettono di valutare gli effetti delle soluzioni studiate in vitro su un organismo vivente, che avrà alcune caratteristiche comuni all'uomo. Di seguito sono riportate le sperimentazioni di alcuni materiali piezoelettrici precedentemente descritti condotte su animali.



### *PHB+chitosano in modelli di pecora*

Nello studio sperimentale condotto da Petrovova et al. [41] si è utilizzato il modello animale di pecora per analizzare la rigenerazione nei difetti della cartilagine del ginocchio. Nella parte mediale della troclea e sul condilo mediale del femore sono stati creati dei difetti artificiali (6x3 mm<sup>2</sup>) con microfratture (Figura 6.8) [41]. In quattro pecore, entrambi i difetti sono stati successivamente riempiti con l'impianto poroso acellulare a base di PHB e chitosano; in due pecore i difetti non sono stati trattati perché fungevano da controllo. La qualità del tessuto neoformato nel sito del difetto è stata valutata attraverso metodi di imaging non invasivi e analisi istologiche. Macroscopicamente, la superficie del tessuto rigenerato corrispondeva a quella della cartilagine circostante. L'esame radiografico sei mesi dopo l'impianto ha confermato il ripristino del contorno nello strato calcificato subcondrale e il tasso avanzato di integrazione del tessuto cartilagineo e osseo. La TAC ha rivelato un basso potenziale rigenerativo nella zona ossea del difetto rispetto alla zona cartilaginea. La densità della neocartilagine di tipo ialino nel sito del difetto non era significativamente diversa dall'area circostante. Utilizzando le tecniche di imaging e la valutazione istologica, si è dimostrato che, dopo sei mesi dall'impianto, il biomateriale composito si era totalmente degradato e aveva offerto un buon processo di riparazione. Pertanto, questo biomateriale composito acellulare risulta essere una soluzione promettente per il trattamento di difetti condrali e osteocondrali di carattere traumatico.



**Figura 6.8** Processo di guarigione del difetto della cartilagine articolare dopo sei mesi dall'impianto dello scaffold PHB-chitosano (asterisco: difetto della troclea femorale, freccia: difetto del condilo femorale): pecora-1 (A), pecora-2 (B), pecora-3 (C), pecora-4 (D) [41].

### *PHBV in modelli di coniglio*

Il confronto tra matrici di PHBV e matrici di collagene contenenti fosfato di calcio (CaP-Gelfix) è alla base di una sperimentazione in vivo in difetti cartilaginei su coniglio, in cui si sono valutate la riparazione della lesione e la rigenerazione di nuovo tessuto.

Nella scanalatura rotulea di entrambe le ginocchia di otto conigli sono stati creati difetti della cartilagine a tutto spessore (4.5 mm di diametro e 4 mm di profondità) nella zona della cartilagine articolare e dell'osso subcondrale usando un trapano elettrico. Gli animali poi sono stati divisi in due gruppi: in un gruppo sono state usate matrici di CaP, mentre nell'altro matrici di PHBV, impiantando sempre nel ginocchio destro la matrice in cui erano stati posti i condrociti e in quello sinistro quella priva di cellule, che fungeva da controllo [43].

I risultati in vivo a 8 e 20 settimane con matrici PHBV hanno presentato una formazione precoce della cartilagine ialina simile alla normale cartilagine articolare, mostrando una reazione minima da corpo estraneo. Nelle matrici CaP si è invece sviluppato un tessuto simile alla fibrocartilagine. Anche se entrambe le matrici si sono dimostrate efficaci nella rigenerazione della cartilagine, il PHBV ha avuto una migliore risposta di guarigione rispetto a CaP.

La proliferazione cellulare è stata osservata mediante valutazioni istologiche, considerando quattro criteri: l'integrazione dei bordi, l'uniformità della superficie della cartilagine, il grado di riempimento del difetto e il colore e l'opacità della neocartilagine [43].

Le valutazioni istologiche macroscopiche hanno rivelato che il PHBV ha mantenuto la sua forma per 21 giorni, mentre il CaP-Gelfix è stato deformato e degradato in 15 giorni. Nel gruppo trattato con PHBV la cartilagine ialina ha riempito completamente l'area del difetto e la superficie del tessuto riparativo è risultata liscia e omogenea, dimostrando un'integrazione del tessuto neofornato con la cartilagine normale adiacente: la matrice è stata quasi tutta assorbita e raramente ne sono stati osservati frammenti [43]. I compositi di scaffold caricati con condrociti hanno stimolato la riparazione della cartilagine ialina più che gli scaffold senza cellule.

In generale questo studio ha dimostrato che le matrici PHBV hanno permesso un'appropriata degradazione graduale e il rimodellamento dei tessuti.

### *PLLA in modelli di coniglio*

Uno studio recente di Liu et al. [19] ha analizzato il comportamento di matrici piezoelettriche di PLLA prive di cellule in modelli di coniglio in combinazione all'esercizio fisico. In particolare, si è notato che la struttura tridimensionale di nanofibre di PLLA ha generato elettricità in presenza della forza applicata su di essa, derivante dal movimento articolare indotto

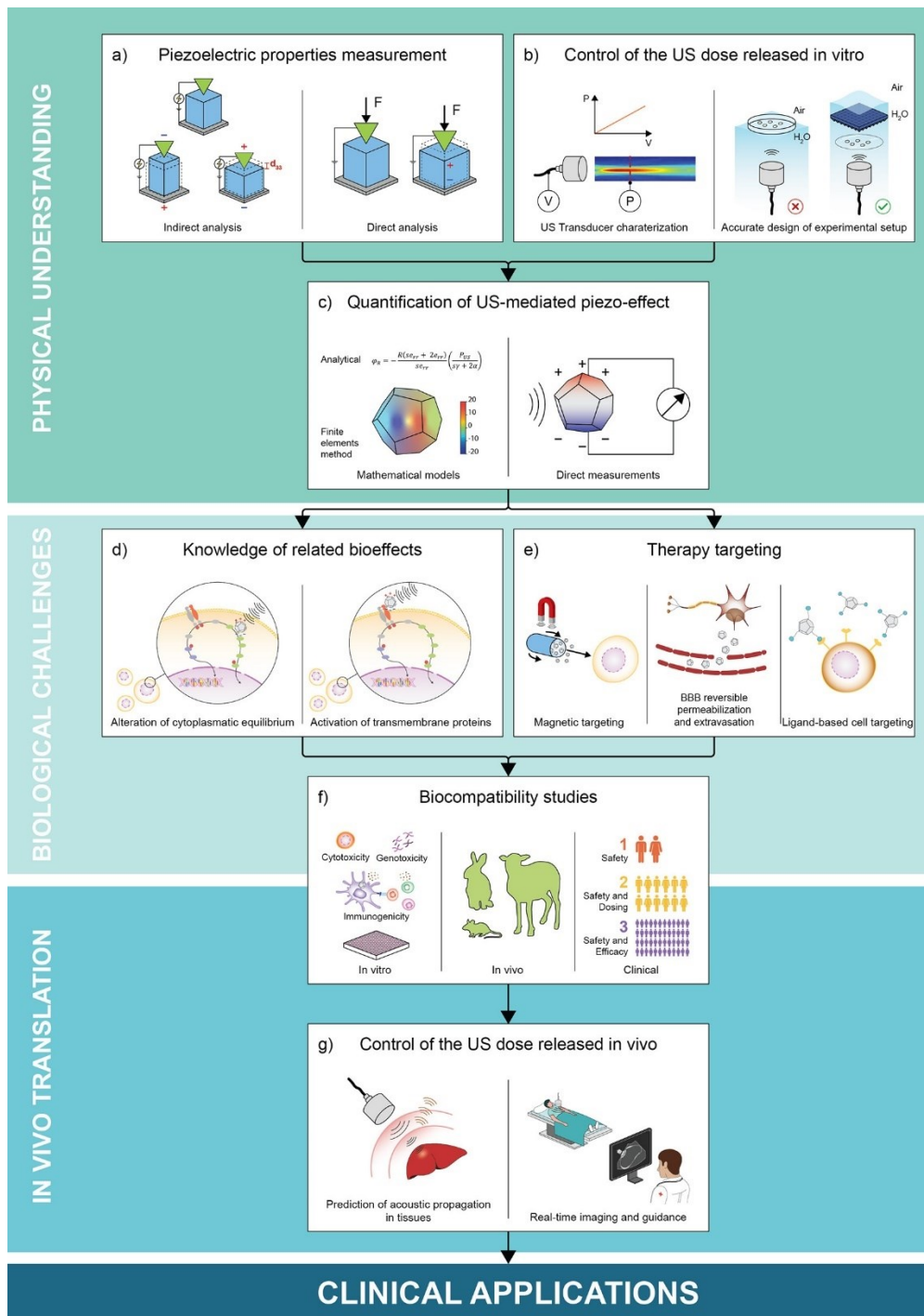


dall'esercizio fisico. Sono stati creati dei difetti osteocondrali di dimensioni critiche (4 mm di diametro e 2 mm di profondità) in entrambe le ginocchia dei conigli, su cui sono state poste le matrici prive di cellule seminate [19]. I conigli, dopo un mese di riposo dall'intervento chirurgico, sono stati allenati su tapis roulant ogni giorno (per 20 minuti) per 1-2 mesi per indurre carichi articolari, stimando una pressione articolare tra i 70 e i 600 kPa [19]. I risultati sul gruppo trattato con scaffold piezoelettrico ed esercizio fisico hanno mostrato un'ottima guarigione del difetto e una buona rigenerazione della cartilagine ialina con abbondanza di condrociti e di espressione del collagene di tipo II. L'esercizio fisico-meccanico ha quindi indotto la polarizzazione del PLLA: la matrice piezoelettrica si è rivelata essere uno stimolatore elettrico autoalimentato in quanto la carica superficiale si origina solo in combinazione con il carico applicato.

La sperimentazione fornisce la prova dell'ipotesi che uno scaffold piezoelettrico PLLA biodegradabile, in associazione con l'esercizio fisico, possa essere utilizzato per trattare i difetti osteocondrali. Tuttavia, ci sono alcune limitazioni e sfide ancora da superare. In primo luogo, è necessario misurare con precisione il carico articolare in vivo, che svolge un ruolo importante nella generazione della carica piezoelettrica. Come stimolatore piezoelettrico, lo scaffold ha anche il potenziale per funzionare simultaneamente come sensore di forza per monitorare questo carico durante il movimento articolare: si potrebbe coniugare un sensore di forza PLLA e l'impalcatura tissutale PLLA per creare un innesto di cartilagine bionico auto-stimolato e auto-monitorato. La microstruttura e i componenti dello scaffold potrebbero anche essere personalizzati per ottimizzare le proprietà per l'impianto e la rigenerazione della cartilagine. Saranno necessarie ricerche future per fornire una migliore comprensione dei meccanismi molecolari alla base della condrogenesi indotta piezoelettricamente, ottimizzare il regime di esercizio per offrire la migliore guarigione della cartilagine in vivo e valutare, ed eventualmente prolungare, la vita funzionale dello scaffold [19].

### **6.3 Approvazione clinica**

Dopo le fasi degli esperimenti in vitro e in vivo, per favorire l'accettazione clinica dell'uso di materiali piezoelettrici, è necessario che essi vengano approvati da un ente notificato. Il percorso da seguire è descritto in Figura 6.9.



**Figura 6.9** Passaggi per l'approvazione clinica delle particelle piezoelettriche: a) misurazione delle proprietà piezoelettriche: la quantificazione accurata dei coefficienti piezoelettrici gioca un ruolo cruciale nella fase di progettazione sperimentale e selezione dei materiali; b) controllo della dose di US rilasciata in vitro: l'uso di sistemi di stimolazione dose-controllata consente una correlazione precisa tra la dose efficace negli US e i risultati biologici; c) quantificazione dell'effetto piezoelettrico mediato dagli US: l'interazione tra onde US e particelle piezoelettriche deve essere ulteriormente esplorata per una migliore comprensione del fenomeno attraverso modelli matematici e misurazioni dirette; d) conoscenza degli effetti bioelettrici innescati: i meccanismi cellulari attivati determinano l'alterazione dell'equilibrio citoplasmatico e l'attivazione di proteine transmembrana; e) targeting terapeutico: nuovi approcci per migliorare un uso mirato in vivo; f) studi di biocompatibilità: analisi accurate sulla biosicurezza delle nanoparticelle devono essere effettuate prima del loro utilizzo in clinica; g) controllo della dose di US rilasciata in vivo: gli US devono essere regolati correttamente per raggiungere il target in vivo con la dose desiderata [34].

Il percorso verso la traduzione clinica è molto lungo e impegnativo: ogni scoperta o ricerca richiede estrema cautela nella valutazione di ogni potenziale effetto dannoso della nanoparticella proposta. Sono ancora necessarie ulteriori ricerche sui processi attraverso i quali i materiali piezoelettrici interagiscono con i tessuti biologici per regolare correttamente le caratteristiche fisiche, elettriche e biologiche degli scaffold per applicazioni di Tissue Engineering e per interpretare adeguatamente sia dati ora disponibili sia quelli futuri su questo argomento. Ulteriori ricerche sulle proprietà piezoelettriche del tessuto osteocondrale nativo sarebbero inoltre importanti non solo per sistematizzare le evidenze raccolte, che a causa delle diverse tecniche di misurazione della piezoelettricità e dei modelli animali utilizzati sono altamente eterogenee, ma anche per identificare quali sarebbero i valori del coefficiente piezoelettrico target ideale per gli scaffold OCTE per fornire stimoli elettrici-meccanici appropriati. Nel complesso, sarebbe interessante concentrarsi maggiormente sullo sviluppo di nuovi scaffold fibrosi piezoelettrici di ossa, cartilagine e OCT, data la loro capacità di combinare sia le proprietà strutturali che la natura piezoelettrica della ECM fibrosa del tessuto, nonché di fornire una piattaforma per la stimolazione elettrica e meccanica di cellule e tessuti [35].

Per quanto riguarda i nanomateriali piezoelettrici, la valutazione della loro biocompatibilità è di fondamentale importanza fin dalle prime fasi della loro indagine. Ciò è particolarmente rilevante se si considera che, molto spesso, vengono proposti materiali del tutto inesplorati, senza una completa caratterizzazione delle loro proprietà chimiche e fisiche. Di conseguenza, attualmente i nanomateriali sono ampiamente studiati da parte degli enti di regolamentazione sanitaria, che stanno adottando misure appropriate per caratterizzarne gli effetti in un contesto biologico. Tale percorso di osservazione e ricerca è ancora più necessario se si considera che i materiali, su scala nanometrica, presentano proprietà completamente diverse rispetto ai materiali originali [34].

La principale questione che ostacola l'utilizzo diffuso di nanomateriali innovativi piezoelettrici per applicazioni biomediche è legata ai possibili effetti avversi a lungo termine, a cui deve essere associata un'attenta valutazione considerando il rapporto rischio-beneficio. Per rispondere a queste richieste, è necessaria una stretta collaborazione tra ricercatori, medici ed enti certificatori [34].

La ricerca biomedica sui nanomateriali piezoelettrici ha raggiunto una fase di sviluppo tale da garantire un'ampia conoscenza del comportamento di questi biomateriali: per tradurre gli studi in reali applicazioni occorre una cooperazione tra ambito scientifico-sperimentale ed ambito medico. Poiché i risultati raccolti nelle ricerche degli ultimi anni sono promettenti, l'obiettivo

attuale è di testare i nanomateriali piezoelettrici, valutando soprattutto bio- e immuno-compatibilità. La capacità dei materiali piezoelettrici di guarire e rigenerare la cartilagine aprirà nuove possibilità per l'ingegneria tissutale [16]. Tuttavia, è ancora necessaria una comprensione più approfondita delle proprietà piezoelettriche dell'OCT e di un'ulteriore ottimizzazione delle proprietà dello scaffold e dei protocolli di stimolazione biofisica per consentire la traslazione clinica di queste strategie [35].

#### **6.4 “Medicina rigenerativa”: approccio autologo**

L'argomento di questa tesi rappresenta un esempio di quella che oggi è chiamata “medicina rigenerativa”. Infatti, il biomateriale, in questo caso caratterizzato da proprietà piezoelettriche, non è più solo legato alla creazione di un dispositivo che miri alla mera sostituzione fisica e alla riparazione del sito danneggiato, ma diventa la fonte di rigenerazione di nuovo tessuto a partire dalle cellule del paziente stesso.

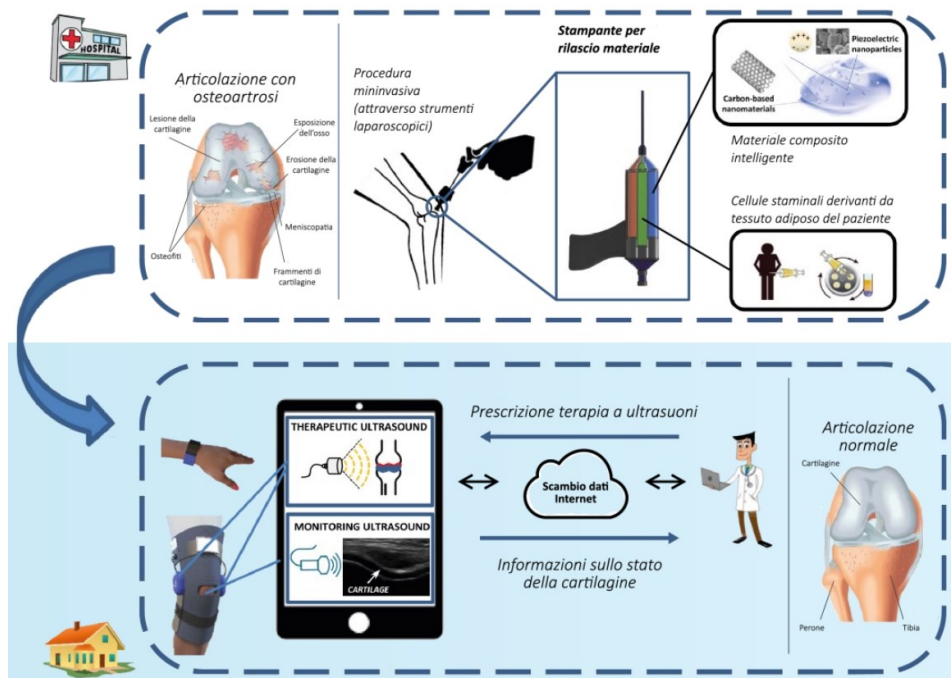
La medicina rigenerativa può cambiare sostanzialmente l'approccio alla cura di molte patologie permettendo di generare tessuti o organi danneggiati, utilizzando cellule prelevate dal paziente e coltivandole su appositi supporti nanostrutturati in laboratorio. L'uso di materiali nanostrutturati è fondamentale dal momento che il comportamento cellulare negli organismi viventi è influenzato da stimoli meccanici, strutturali e chimici che vengono modulati su scala nanometrica. Per questo motivo, metodologie provenienti da aree scientifiche anche apparentemente molto distanti, devono essere integrate per riprodurre la complessità osservata in natura [52].

Da un approccio eterologo, basato su xenotrapianti, allotrapianti e farmaci e che considera il paziente come un soggetto appartenente a un gruppo omogeneo, si è passati a un approccio autologo, basato invece su autotrapianti e che considera il paziente come individuo a sé; l'obiettivo finale di questo approccio è quello di “personalizzare” il trattamento terapeutico, considerando sia lo stato del paziente e le sue abitudini di vita sia le opportunità in ambito medico. Per raggiungere appieno questo obiettivo è però necessario conoscere diversi aspetti come le proprietà delle cellule e dei materiali di supporto, le interazioni tra cellule e superfici, l'adesione e la crescita delle cellule sulla superficie del materiale di supporto, la promozione di adesione e differenziazione delle cellule attraverso l'uso di segnali molecolari specifici, le interazioni tra materiali di supporto e ambiente biologico.

Al fine di sviluppare terapie personalizzate e mirate sono già stati introdotti strumenti diagnostici per definire lo stato delle componenti dell'unità osteocondrale durante la malattia. Sono stati compiuti progressi nello sviluppo di biomarcatori solubili, che riflettono i

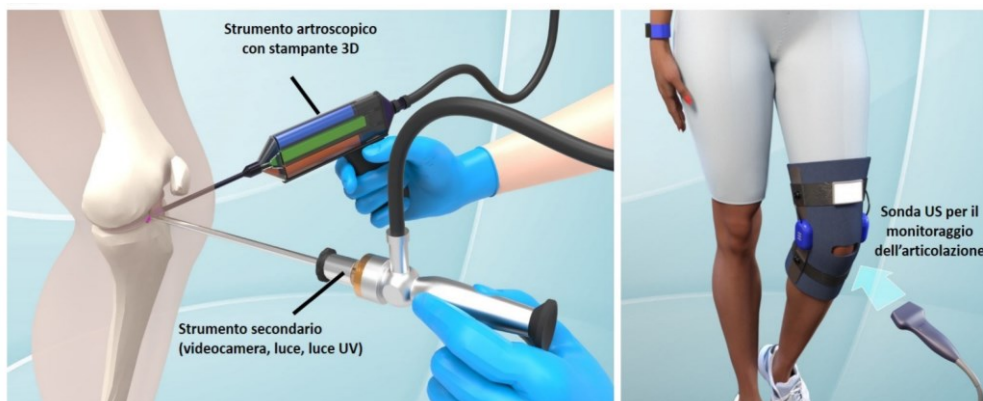
cambiamenti in corso nell'attività cellulare e nel rimodellamento della matrice nella cartilagine articolare e nell'osso, nonché la presenza di infiammazione sinoviale; il progresso si è inoltre dimostrato nello sviluppo della risonanza magnetica e di altre tecnologie di imaging in grado di fornire informazioni sull'organizzazione strutturale dei tessuti articolari, nonché approfondimenti sulla loro composizione e attività metabolica. I biomarcatori biologici e le tecnologie di imaging sono estremamente utili per promuovere futuri miglioramenti nel rilevamento della patologia articolare dell'osteoartrite in una fase primaria e antecedente lo sviluppo di danni irreversibili ai tessuti [8].

Per quanto riguarda le patologie legate alla cartilagine, attualmente ci si concentra su studi che mirino, a lungo termine, ad aumentare la durata della vita sana e attiva delle persone affette da osteoartrite, rallentando notevolmente o addirittura arrestando il processo degenerativo, con l'obiettivo di ritardare di diversi anni o evitare interventi chirurgici per la sostituzione totale dell'articolazione. Per questo nel 2019 ha avuto inizio il progetto di ricerca ADMAIORA (ADvanced nanocomposite MAterials fOr in situ treatment and ultRASound-mediated management of osteoarthritis). Questo progetto ha l'obiettivo di sviluppare una terapia capace di ridurre gli effetti dell'osteoartrite e dimostrarla a livello preclinico. Esso propone una nuova soluzione per un trattamento effettivo della degenerazione della cartilagine basata sulla cooperazione di: un idrogel nanocomposito sensibile agli ultrasuoni, ADSCs e ultrasuoni pulsati a bassa intensità (LIPUS, Low-Intensity Pulsed Ultrasound) (Figura 6.10) [53]. Gli studi si concentrano soprattutto nella ricerca di un idrogel biosintetico, con incorporati nanomateriali a base di carbonio che conferiscono elevate proprietà meccaniche e di lubrificazione, e nanoparticelle piezoelettriche, sensibili alle onde ultrasoniche wireless. Essi comprendono vari ambiti, come la stimolazione controllata di cellule e tessuti mediante ultrasuoni, la ricerca di sistemi innovativi per il rilascio nella cartilagine di molecole terapeutiche e lo sviluppo di nuovi materiali in grado di contenere al loro interno cellule staminali e nanoparticelle intelligenti. I materiali studiati, tra cui un tipo di polimero naturale come la gomma gellano, dovranno lavorare in sinergia con delle particelle piezoelettriche per indirizzare le cellule staminali alla rigenerazione del tessuto cartilagineo nel paziente una volta impiantate.



**Figura 6.10** Fasi del progetto ADMAIORA basate su un primario intervento chirurgico in ospedale e poi sulla stimolazione continua attraverso ultrasuoni in casa, con l’invio dei dati al medico in merito allo stato della rigenerazione della cartilagine [53].

Si è sviluppato inoltre un artroscopio, che è in grado di depositare il materiale creato nei punti d’interesse, sotto la guida del chirurgo; a ciò si aggiunge la progettazione di un tutore personalizzato, dotato di trasduttori ultrasonografici, utili sia per stimolare l’idrogel nanocomposito sensibile agli ultrasuoni sia per monitorare lo stato dell’articolazione (Figura 6.11).



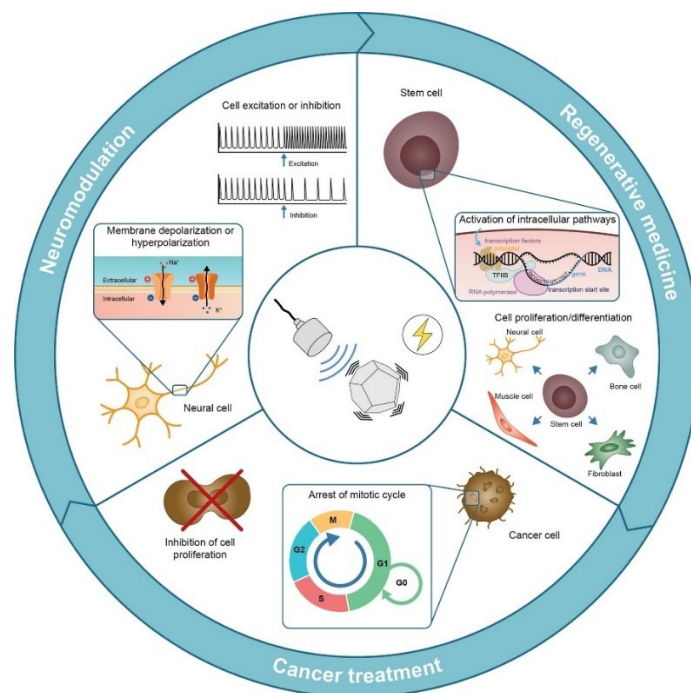
**Figura 6.11** Strumento chirurgico e tutore idealizzati nel progetto ADMAIORA [53].

Il progetto include anche l’ideazione di un’app dedicata, che permette sia di monitorare lo stato dell’innesto inserito sia la comunicazione tra il paziente e il medico. Oltre alla parte tecnica del progetto si sono organizzati degli eventi specifici rivolti a chirurghi e a pazienti con l’obiettivo di coinvolgerli direttamente nella sperimentazione in modo da rafforzare sempre di più il collegamento tra ricerca e società.

I risultati del progetto dovrebbero migliorare notevolmente la qualità della vita dei pazienti e la loro durata di vita sana e attiva a lungo termine, promuovendo così un invecchiamento sano e attivo. Ciò implicherebbe anche una notevole riduzione dell'onere finanziario sui sistemi sanitari in relazione all'OA.

In generale la piezoelettricità è un argomento che si sta sviluppando in molti settori della sfera biomedica e rappresenta un possibile approccio rivoluzionario in diversi campi della medicina: oltre che nell'ingegneria tissutale per la medicina rigenerativa, si stanno conducendo ricerche anche nella neuromodulazione e nel trattamento dei tumori (Figura 6.12). In particolare, la stimolazione piezoelettrica è in grado di arrestare il ciclo cellulare del cancro, inibendo la proliferazione delle cellule tumorali: sono stati dimostrati effetti antitumorali sia su cellule di cancro al seno sia su cellule del glioblastoma multiforme [34].

Nonostante sia poco esplorato, un altro campo interessante di ricerca è l'uso dei nanomateriali piezoelettrici e degli US per modulare la somministrazione di farmaci, garantendo un rilascio controllato e graduale del principio terapeutico ai tessuti bersaglio [30], [34].



**Figura 6.12** Principali domini di ricerca della stimolazione di nanoparticelle piezoelettriche attivata dagli US: neuromodulazione, medicina rigenerativa e trattamento del cancro [34].

## Conclusioni

L'ingegneria tessutale rappresenta un ambito di grande interesse nel campo biomedicale dal momento che impone un radicale cambiamento di prospettiva: da un approccio terapeutico di tipo sostitutivo a uno di tipo rigenerativo. L'uso di materiali piezoelettrici per indurre la neomorfogenesi di tessuti biologici rappresenta in questo contesto un valore aggiunto.

Le tecniche proposte prima dell'avvento dell'ingegneria tissutale non hanno come obiettivo quello di rigenerare nuovo tessuto, ma solo quello di ridurre il dolore nei pazienti, portando inoltre alla formazione di un tessuto cartilagineo molto simile alla fibrocartilagine, la quale presenta proprietà meccaniche inferiori alla cartilagine articolare e che, nel tempo, potrebbe causare un successivo deterioramento. Si è infatti potuto riscontrare che nessuna delle procedure chirurgiche intese come terapie riparative fino ad oggi adottate, risulta ottimale nel trattamento delle lesioni cartilaginee e i risultati a lungo termine sono stati valutati in modo non del tutto soddisfacente. Per ottenere migliori risposte a lungo termine, sono state proposte applicazioni di ingegneria tissutale, che sembrano possedere caratteristiche interessanti per la riparazione della cartilagine. Sono stati studiati molti tipi di materiali piezoelettrici in questo campo e diversi metodi sono stati proposti per la produzione delle strutture ingegnerizzate. Oggigiorno, la fondamentale sfida relativa alla rigenerazione della cartilagine riguarda la traslazione clinica delle tecniche fino ad ora elaborate: mentre è disponibile un gran numero di ricerche e sperimentazioni in vitro, gli esempi di applicazione su animali sono limitati. Questo dimostra la rilevanza e l'ampio interesse che caratterizzano i materiali piezoelettrici, ma anche le numerose limitazioni associate all'effettiva applicabilità di questa nuova tecnica. Attualmente, infatti, non esiste una procedura di ingegneria tissutale standardizzata per il trattamento dei difetti cartilaginei che prevede l'uso della piezoelettricità. Sono necessari infatti studi clinici per poter affermare la sicura efficacia dei metodi studiati in vitro, associati a trial clinici a lungo termine per validarne i risultati.

Nonostante la caratteristica piezoelettrica sia comune a vari tipi di biomateriali, la loro natura chimica li differenzia molto; inoltre, per trovare il tipo più adatto alla specifica applicazione, occorre considerare anche la variabilità tra i diversi pazienti, che può costituire un fattore critico in questo campo.

Anche l'ingegneria tissutale porta con sé alcune limitazioni, come la selezione delle cellule per la ricostruzione del tessuto e le difficoltà tecniche nella produzione di scaffold con architetture specifiche, a cui si associano le problematiche di biocompatibilità delle nanoparticelle piezoelettriche. Nonostante queste criticità, è indubbio l'effetto positivo dei materiali



piezoelettrici sull'ambiente biologico, i quali rappresentano nel complesso una strategia promettente per migliorare la formazione di nuovo tessuto, fornendo un microambiente "intelligente" ed elettricamente attivo.

## Bibliografia

- [1] V. Taglietti, «*Biologia, Fisiologia e Anatomia per Ingegneria Biomedica*». 2021.
- [2] C. Di Bello e A. Bagno, «*Biomateriali: dalla scienza dei materiali alle applicazioni cliniche*», 2<sup>a</sup> ed. Bologna, 2016.
- [3] K. S. Saladin, S. Galli, C. A. Gan, e R. De Caro, «*Anatomia umana*», 3<sup>a</sup> ed. Padova, 2022.
- [4] L. C. Junqueira, J. Carniero, R. O. Kelley, G. Garinei, e V. Mazzi, «*Compendio di istologia*», 2<sup>a</sup> ed. Padova, 1991.
- [5] G. Barbatelli, «*Anatomia umana: fondamenti: con istituzioni di istologia*». Milano, 2018.
- [6] L. Zhang, J. Hu, e K. A. Athanasiou, «The Role of Tissue Engineering in Articular Cartilage Repair and Regeneration», 2021.
- [7] A. M. Bhosale e J. B. Richardson, «Articular cartilage: Structure, injuries and review of management», *British Medical Bulletin*, vol. 87, n. 1. pagg. 77–95, settembre 2008. doi: 10.1093/bmb/ldn025.
- [8] S. R. Goldring e M. B. Goldring, «Changes in the osteochondral unit during osteoarthritis: Structure, function and cartilage bone crosstalk», *Nature Reviews Rheumatology*, vol. 12, n. 11. Nature Publishing Group, pagg. 632–644, 1 novembre 2016. doi: 10.1038/nrrheum.2016.148.
- [9] A. R. Poole *et al.*, «CARTILAGE BIOLOGY Composition and Structure of Articular Cartilage A Template for Tissue Repair», 2001.
- [10] Y. C. Fung, «*Biomechanics: mechanical properties of living tissues*», 2<sup>a</sup> ed. New York, 1993.
- [11] P. Poillot, C. L. Le Maitre, e J. M. Huyghe, «The strain-generated electrical potential in cartilaginous tissues: a role for piezoelectricity», *Biophys Rev*, vol. 13, n. 1, pagg. 91–100, feb. 2021, doi: 10.1007/s12551-021-00779-9.
- [12] M. K. Kwan, W. M. Llrtr, e V. C. Mow+, «A FINITE DEFORMATION THEORY FOR CARTILAGE AND OTHER SOFT HYDRATED CONNECTIVE TISSUES-I. EQUILIBRIUM RESULTS», 1990.
- [13] C. D. Hoemann, «COMPOSITION AND METHOD FOR THE REPAIR AND REGENERATION OF CARTILAGE AND OTHER TISSUES INVENTORS», 2011.
- [14] D. Trucco *et al.*, «Graphene Oxide-Doped Gellan Gum–PEGDA Bilayered Hydrogel Mimicking the Mechanical and Lubrication Properties of Articular Cartilage», *Adv Healthc Mater*, vol. 10, n. 7, apr. 2021, doi: 10.1002/adhm.202001434.
- [15] S. Todesco e P. F. Gambari, «*Malattie reumatiche*», 4<sup>a</sup> ed. Milano, 2007.
- [16] Z. Zhou, J. Zheng, X. Meng, e F. Wang, «Effects of Electrical Stimulation on Articular Cartilage Regeneration with a Focus on Piezoelectric Biomaterials for Articular Cartilage Tissue Repair and Engineering», *Int J Mol Sci*, vol. 24, n. 3, pag. 1836, gen. 2023, doi: 10.3390/ijms24031836.
- [17] L. Ricotti *et al.*, «Material and system for the therapeutic treatment of joints», n. 43, 2020.
- [18] L. A. Vonk, G. Roël, J. Hernigou, C. Kaps, e P. Hernigou, «Role of matrix-associated autologous chondrocyte implantation with spheroids in the treatment of large chondral defects in the knee: A systematic review», *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22, n. 13. MDPI, 1 luglio 2021. doi: 10.3390/ijms22137149.
- [19] Y. Liu *et al.*, «Exercise-induced piezoelectric stimulation for cartilage regeneration in rabbits», 2022. [Online]. Disponibile su: <https://www.science.org>
- [20] «[https://it.wikipedia.org/wiki/Artrite\\_reumatoide](https://it.wikipedia.org/wiki/Artrite_reumatoide)».
- [21] S. Panseri *et al.*, «Osteochondral tissue engineering approaches for articular cartilage and subchondral bone regeneration», *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, vol. 20, n. 6. pagg. 1182–1191, giugno 2012. doi: 10.1007/s00167-011-1655-1.

- [22] N. More e G. Kapusetti, «Piezoelectric material – A promising approach for bone and cartilage regeneration», *Med Hypotheses*, vol. 108, pagg. 10–16, ott. 2017, doi: 10.1016/j.mehy.2017.07.021.
- [23] «[https://it.wikipedia.org/wiki/Cartilagine\\_articolare](https://it.wikipedia.org/wiki/Cartilagine_articolare)».
- [24] J. Jacob, N. More, K. Kalia, e G. Kapusetti, «Piezoelectric smart biomaterials for bone and cartilage tissue engineering», *Inflamm Regen*, vol. 38, n. 1, feb. 2018, doi: 10.1186/s41232-018-0059-8.
- [25] A. Najjari *et al.*, «Smart piezoelectric biomaterials for tissue engineering and regenerative medicine: A review», *Biomedizinische Technik*, vol. 67, n. 2, pagg. 71–88, apr. 2022, doi: 10.1515/bmt-2021-0265.
- [26] Q. Liu *et al.*, «Integrated osteochondral differentiation of mesenchymal stem cells on biomimetic nanofibrous mats with cell adhesion-generated piezopotential gradients», *Nanoscale*, vol. 14, n. 10, pagg. 3865–3877, gen. 2022, doi: 10.1039/d1nr06676e.
- [27] B. E. Grottkau, Z. Hui, e Y. Pang, «Articular Cartilage Regeneration through Bioassembling Spherical Micro-Cartilage Building Blocks», *Cells*, vol. 11, n. 20, ott. 2022, doi: 10.3390/cells11203244.
- [28] S. M. Damaraju *et al.*, «Three-dimensional piezoelectric fibrous scaffolds selectively promote mesenchymal stem cell differentiation», *Biomaterials*, vol. 149, pagg. 51–62, dic. 2017, doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.09.024.
- [29] S. Dhaniala *et al.*, «Scaffolds the backbone of tissue engineering: Advancements in use of polyhydroxyalkanoates (PHA)», *Int J Biol Macromol*, vol. 208, pagg. 243–259, mag. 2022, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.03.030.
- [30] K. Kapat, Q. T. H. Shubhra, M. Zhou, e S. Leeuwenburgh, «Piezoelectric Nano-Biomaterials for Biomedicine and Tissue Regeneration», *Advanced Functional Materials*, vol. 30, n. 44. Wiley-VCH Verlag, 1 ottobre 2020. doi: 10.1002/adfm.201909045.
- [31] A. Pryadko, M. A. Surmeneva, e R. A. Surmenev, «Review of Hybrid Materials Based on Polyhydroxyalkanoates for Tissue Engineering Applications.», *Polymers (Basel)*, vol. 13, n. 11, mag. 2021, doi: 10.3390/polym13111738.
- [32] N. More, D. Ranglani, A. R. Hiray, e G. Kapusetti, «Piezoelectric ceramics as stimulatory modulators for regenerative medicine», in *Advanced Ceramics for Versatile Interdisciplinary Applications*, Elsevier, 2022, pagg. 313–338. doi: 10.1016/B978-0-323-89952-9.00005-1.
- [33] P. Dineva, D. Gross, R. Müller, e T. Rangelov, *Dynamic Fracture of Piezoelectric Materials*. [Online]. Disponibile su: <http://www.springer.com/series/6557>
- [34] A. Cafarelli *et al.*, «Piezoelectric Nanomaterials Activated by Ultrasound: The Pathway from Discovery to Future Clinical Adoption», *ACS Nano*, vol. 15, n. 7. American Chemical Society, pagg. 11066–11086, 27 luglio 2021. doi: 10.1021/acsnano.1c03087.
- [35] F. Barbosa, F. C. Ferreira, e J. C. Silva, «Piezoelectric Electrospun Fibrous Scaffolds for Bone, Articular Cartilage and Osteochondral Tissue Engineering», *Int J Mol Sci*, vol. 23, n. 6, mar. 2022, doi: 10.3390/ijms23062907.
- [36] J. Jacob, N. More, C. Mounika, P. Gondaliya, K. Kalia, e G. Kapusetti, «Smart Piezoelectric Nanohybrid of Poly(3-hydroxybutyrate- co-3-hydroxyvalerate) and Barium Titanate for Stimulated Cartilage Regeneration», *ACS Appl Bio Mater*, vol. 2, n. 11, pagg. 4922–4931, nov. 2019, doi: 10.1021/acsubm.9b00667.
- [37] D. Sadeghi, S. Karbasi, S. Razavi, S. Mohammadi, M. A. Shokrgozar, e S. Bonakdar, «Electrospun poly(hydroxybutyrate)/chitosan blend fibrous scaffolds for cartilage tissue engineering», *J Appl Polym Sci*, vol. 133, n. 47, dic. 2016, doi: 10.1002/app.44171.
- [38] N. More, A. Srivastava, e G. Kapusetti, «Graphene Oxide Reinforcement Enhances the Piezoelectric and Mechanical Properties of Poly(3-hydroxybutyrate- co-3-hydroxy valerate)-Based Nanofibrous Scaffolds for Improved Proliferation of Chondrocytes and ECM

- Production», *ACS Appl Bio Mater*, vol. 3, n. 10, pagg. 6823–6835, ott. 2020, doi: 10.1021/acsabm.0c00765.
- [39] A. Przekora, «Current trends in fabrication of biomaterials for bone and cartilage regeneration: Materials modifications and biophysical stimulations», *Int J Mol Sci*, vol. 20, n. 2, gen. 2019, doi: 10.3390/ijms20020435.
- [40] S. Khorshidi, S. Ansari, Z. Naghizadeh, N. Akbari, A. Karkhaneh, e N. Haghighipour, «Concurrent effects of piezoelectricity and hydrostatic pressure on chondrogenic differentiation of stem cells», *Mater Lett*, vol. 246, pagg. 71–75, lug. 2019, doi: 10.1016/j.matlet.2019.03.038.
- [41] E. Petrovova *et al.*, «Phb/chit scaffold as a promising biopolymer in the treatment of osteochondral defects—an experimental animal study», *Polymers (Basel)*, vol. 13, n. 8, apr. 2021, doi: 10.3390/polym13081232.
- [42] C. Ning, Z. Zhou, G. Tan, Y. Zhu, e C. Mao, «Electroactive polymers for tissue regeneration: Developments and perspectives», *Prog Polym Sci*, vol. 81, pagg. 144–162, giu. 2018, doi: 10.1016/j.progpolymsci.2018.01.001.
- [43] G. T. Köse *et al.*, «Tissue engineered cartilage on collagen and PHBV matrices», *Biomaterials*, vol. 26, n. 25, pagg. 5187–5197, set. 2005, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2005.01.037.
- [44] F. R. Baxter, C. R. Bowen, I. G. Turner, e A. C. E. Dent, «Electrically active bioceramics: A review of interfacial responses», *Ann Biomed Eng*, vol. 38, n. 6, pagg. 2079–2092, giu. 2010, doi: 10.1007/s10439-010-9977-6.
- [45] L. Kock, C. C. Van Donkelaar, e K. Ito, «Tissue engineering of functional articular cartilage: The current status», *Cell and Tissue Research*, vol. 347, n. 3, pagg. 613–627, marzo 2012, doi: 10.1007/s00441-011-1243-1.
- [46] C. Manferdini *et al.*, «Mesenchymal Stromal Cells Laden in Hydrogels for Osteoarthritis Cartilage Regeneration: A Systematic Review from In Vitro Studies to Clinical Applications», *Cells*, vol. 11, n. 24, MDPI, 1 dicembre 2022, doi: 10.3390/cells11243969.
- [47] L. Roseti *et al.*, «Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives», *Materials Science and Engineering C*, vol. 78, Elsevier Ltd, pagg. 1246–1262, 1 settembre 2017, doi: 10.1016/j.msec.2017.05.017.
- [48] F. Fontana *et al.*, «Development and validation of low-intensity pulsed ultrasound systems for highly controlled in vitro cell stimulation», *Ultrasonics*, vol. 116, set. 2021, doi: 10.1016/j.ultras.2021.106495.
- [49] Z. Mohammadalizadeh, S. Karbasi, e S. Arasteh, «Physical, mechanical and biological evaluation of poly (3-hydroxybutyrate)-chitosan/MWNTs as a novel electrospun scaffold for cartilage tissue engineering applications», *Polymer-Plastics Technology and Materials*, vol. 59, n. 4, pagg. 417–429, mar. 2020, doi: 10.1080/25740881.2019.1647244.
- [50] S. Karbasi e Z. M. Alizadeh, «Effects of multi-wall carbon nanotubes on structural and mechanical properties of poly(3-hydroxybutyrate)/chitosan electrospun scaffolds for cartilage tissue engineering», *Bulletin of Materials Science*, vol. 40, n. 6, pagg. 1247–1253, ott. 2017, doi: 10.1007/s12034-017-1479-9.
- [51] M. Nikbakht, S. Karbasi, e S. M. Rezayat, «Biological evaluation of the effects of hyaluronic acid on poly (3-hydroxybutyrate) based electrospun nanocomposite scaffolds for cartilage tissue engineering application», *Materials Technology*, vol. 35, n. 3, pagg. 141–151, 2020, doi: 10.1080/10667857.2019.1659535.
- [52] P. Milani, «Medicina rigenerativa e Nanomateriali». [Online]. Disponibile su: <http://www.reading.ac.uk/cellmigration/matrix.htm>
- [53] «<https://www.admaiora-project.com/>».

