



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
FACOLTÀ DI INGEGNERIA

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA
DELL'INFORMAZIONE

TESI DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

Nuovi sostituti cutanei

RELATORE: CH.MO PROF. ANDREA BAGNO

(Dipartimento di ingegneria industriale)

LAUREANDA: ELISA MENTI

26/09/2013

ANNO ACCADEMICO 2012-2013

0.	Abstract	pag.4
1.	Introduzione	pag.4
2.	La struttura della cute.....	pag.7
3.	Elementi chiave dell'ingegneria tessutale.....	pag.12
3.1	Cellule.....	pag.12
3.2	Scaffold.....	pag.15
3.2.1	Proprietà	pag.16
3.2.2	Tecniche di fabbricazione	pag.17
3.2.2.1	Elettrospinning.....	pag.18
3.2.2.2	Self-Assembling Peptides	pag.20
3.2.2.3	Solid Freeform Fabrication	pag.22
3.3	Fattori di crescita.....	pag.22
3.4	Fattori di adesione.....	pag.24
4.	Sostituti cutanei	pag.26
4.1	Equivalenti dell'epidermide	pag.27
4.2	Equivalenti del derma.....	pag.28
4.3	Sostituti dermo-epidermici.....	pag.34
4.4	Considerazioni generali.....	pag.39
5.	Applicazioni cliniche e pre-cliniche.....	pag.41
5.1	Applicazioni in vitro.....	pag.41
5.1.1	Test basati su modelli cutanei	pag.42
5.1.2	Modelli per le malattie cutanee.....	pag.46
5.1.2.1	Modelli per il trattamento della psoriasi e dell'herpes	pag.46
5.1.2.2	Modelli per la cura del melanoma	pag.47
5.1.2.3	Modelli per wound healing	pag.48
5.2	Applicazioni in vivo.....	pag.50
5.2.1	Trattamento del melanoma	pag.52
6.	Conclusioni.....	pag.54
7.	Bibliografia.....	pag.56

0. ABSTRACT

Il primo campo di applicazione dell'ingegneria tessutale è stato la cute, l'organo più esteso del corpo umano, spesso soggetto, in virtù del suo contatto diretto con l'ambiente esterno, a danni fisico-chimici. Sebbene il problema sussista e venga studiato già da diversi anni, una sua completa risoluzione deve ancora avere luogo. La complessità della struttura della pelle, infatti, che permette all'organo di svolgere numerose funzioni vitali, rende difficile la creazione in laboratorio di sostituti cutanei che risultino non solo biologicamente compatibili, ma soprattutto funzionalmente efficienti. In particolar modo vascolarizzazione ed innervazione del neo-tessuto risultano fattori critici per questi costrutti, sui quali grava anche la mancanza, allo stato dell'arte, degli annessi cutanei quali follicoli piliferi e ghiandole sudoripare. Nella presente tesina, frutto di una estesa indagine bibliografica, vengono esposte le attuali tecniche dell'ingegneria tessutale, analizzando nel dettaglio gli aspetti applicativi legati alla produzione di sostituti cutanei da utilizzare nella pratica clinica.

1. INTRODUZIONE

La perdita dell'integrità della cute a causa di una ferita o di una malattia comporta una vera e propria disabilità per il paziente e, nel caso di regioni lese molto ampie, può portare anche alla morte dello stesso. Fin dalla scoperta del fuoco nacque la necessità di realizzare dei sostituti chirurgici della pelle, l'organo più esteso del corpo umano. Riferimenti ad un tale approccio risalgono al 1500, quando lo scopo principale che ci si prefiggeva era semplicemente quello di garantire la sopravvivenza del paziente e una minor attenzione era posta nel recupero delle funzionalità di quest'organo vitale. Rheinwald e Green, nel 1979, proposero di utilizzare le colture di lamine di cheratinociti, coltivati secondo il metodo da loro stessi messo a punto quattro anni prima, per il trattamento di estese lesioni del tessuto cutaneo [1].

La prima applicazione clinica di autoinnesti di cheratinociti coltivati è avvenuta su pazienti pediatrici gravemente ustionati. Da allora il campo di applicazione ha

coinvolto anche altre patologie, caratterizzate da lesioni cutanee di difficile trattamento con le metodiche tradizionali. La possibilità di trattare ferite di varia natura con allo- e auto-cheratinociti è oggi una realtà che mira a lasciare il posto alla progettazione di cute ingegnerizzata. La riparazione cutanea è stato il primo campo di applicazione delle tecniche del Tissue Engineering ed è tuttora uno dei settori maggiormente studiati in ambito clinico.

Secondo una prima definizione data da Vacanti, *“Tissue engineering is an interdisciplinary field that applies the principles of engineering and life sciences toward the development of biological substitutes that restore, maintain, or improve tissue function or a whole organ”* [2].

Per ripristinare l'integrità funzionale ed estetica della cute in pazienti ustionati o soggetti alla perdita di tessuto dovuta a lesioni o a ragioni ereditarie e oncologiche si possono sfruttare autotrapianto, allotrapianto, xenotrapianto oppure ci si può servire dei costrutti sintetizzati in laboratorio.

L'autotrapianto, metodo ampiamente utilizzato, consiste nel prelievo di cellule da un sito sano del paziente e nel loro successivo impiego per rigenerare la ferita. Lo svantaggio rilevante è il trauma aggiuntivo sostenuto dal paziente, trauma che grava ulteriormente sulle sue condizioni fisiche e sulla formazione di cicatrici. La procedura richiede un tempo d'attesa non sempre accettabile e la quantità di tessuto asportabile è limitata, tanto da risultare di difficile applicazione nei pazienti affetti da lesioni che coprono il 50-60% dell'area totale del corpo.

Ad ogni modo l'autoinnesto viene utilizzato per trattamenti a breve termine atti a impedire la perdita dei fluidi corporei nei pazienti gravemente ustionati. Mentre nel 1952 solo la metà dei pazienti pediatrici con ustioni nel 50% della TBSA (Total Body Surface Area) sopravvivevano, oggi si ha la stessa percentuale di sopravvivenza quando le lesioni coprono il 98% della TBSA [3]. Questa significativa diminuzione del tasso di mortalità nei bambini ustionati deriva, oltre dall'avvento dell'autotrapianto, anche da un maggior controllo igienico volto a prevenire le infezioni.

Nel caso di allotrapianto le cellule si ottengono da individui, solitamente cadaveri, appartenenti alla medesima specie, ma aventi un diverso codice genetico.

Peter Medawar sottolineò ben presto come il rigetto e la progressiva perdita di tessuto fossero da elencare tra i principali inconvenienti connessi all'utilizzo di

cute prelevata da cadavere. La trasmissione di malattie tra cui anche Epatite e Aids è un rischio che non può essere escluso e che iniziò ad essere riconosciuto tale nel 1980 riducendo drasticamente l'utilizzo di questi innesti. Nella prospettiva di sfruttare tessuti eterologhi si parla di xenotrapianto quando specie donatrice e ricevente sono diverse, ovvero nel caso di cute prelevata dagli animali. La pelle porcina è diventata di uso comune negli anni '60 ed è attualmente lo xenotrapianto più usato, trattandosi dell'animale che più somiglia, dal punto di vista biologico-dimensionale, all'uomo. In tali costrutti il tessuto viene privato dell'epidermide (DED) e in seguito immagazzinato e adoperato come rivestimento temporaneo. Tuttavia i possibili residui cellulari potrebbero causare fenomeni di rigetto in seguito all'innesto. La quantità di tessuto a disposizione risulta certamente maggiore rispetto al prelievo di tessuto umano, ma si cerca sempre di ridurre il più possibile queste pratiche connesse allo sfruttamento animale.

Infine la terza procedura consiste nella sintesi dei tessuti in laboratorio ed è oggi la strada maggiormente seguita e in continuo sviluppo. L'ingegneria tissutale è volta alla creazione in vitro di tessuti idonei a sopperire ai bisogni clinici del paziente. Si necessita di una linea cellulare, di un substrato su cui far aderire le cellule e di fattori di crescita che ne promuovano proliferazione e differenziazione. Questi sostituti offrono protezione dalla perdita dei fluidi corporei e dalla contaminazione, risolvendo oltretutto il problema connesso alla ridotta disponibilità di tessuto autologo ed eterologo.

In questo elaborato si considerano i sostituti cutanei finora sperimentati, e se ne fa un'analisi dettagliata connessa alle problematiche e ai limiti che si vengono a presentare durante il loro impiego. In generale vi è mancanza d'informazione riguardante la trasposizione in vivo dei risultati acquisiti in vitro: molti studi, concernenti dei potenziali sostituti della pelle, sembrano terminare con lo studio in vitro. Gli studi in vivo sono rari e le applicazioni ad alcune ferite lo sono ancora di più. Si tratta di un limite rilevante: un successo in vitro non è condizione sufficiente, ma solo necessaria, ai fini di un buon risultato anche nell'applicazione sull'uomo. E' bene dire fin da subito che, sebbene la cute sia oggetto di studi da diversi anni, allo stato dell'arte non sono presenti dei modelli di pelle ingegnerizzata che ricalcano esattamente la natura del tessuto lesa.

2. LA STRUTTURA DELLA CUTE

La cute è un organo complesso che ricopre l'intera superficie corporea e svolge diverse funzioni fra cui la principale è formare una barriera fisica tra il corpo umano e l'ambiente circostante: si tratta della prima linea di difesa dell'organismo contro eventuali aggressioni esterne da parte di agenti patogeni e microorganismi. Essa infatti permette e allo stesso tempo limita il passaggio da e verso l'organismo di acqua ed elettroliti ai fini di mantenere il giusto equilibrio idrico dei tessuti e di altre sostanze che conferiscono protezione contro microorganismi, radiazioni ultraviolette e agenti tossici. Alla funzione di difesa dai danni fisico-chimici si affianca quella di ricezione degli stimoli tattici, termici e dolorifici provenienti dall'esterno.

La cute riveste l'importante ruolo di termoregolazione grazie alla presenza delle ghiandole sudoripare e di una fitta rete di capillari: la vasodilatazione infatti provoca un incremento del flusso ematico locale che favorisce la cessione di calore all'esterno; viceversa, la vasocostrizione, riducendo la quantità di sangue in transito, preserva le dispersioni termiche [4]. Quest'organo provvede inoltre alla produzione di vitamina D, utile al mantenimento di calcio e fosforo nelle ossa. Per le molteplici funzionalità che riveste, i danni provocati da una perdita ingente di tessuto possono causare gravi alterazioni sistemiche e portare alla morte del paziente.

La cute è anatomicamente costituita da tre strati, diversi per localizzazione, struttura e proprietà. Partendo dalla superficie ed arrivando in profondità si trovano epidermide, derma e ipoderma [Fig. 2.1]. Completano la struttura della pelle i cosiddetti annessi cutanei, che comprendono ghiandole, apparato circolatorio e terminazioni nervose.

L'epidermide funge essenzialmente da barriera, impedendo da un lato la penetrazione di sostanze estranee e microorganismi e dall'altro la perdita di acqua ed elettroliti dall'organismo. Questo strato non è vascolarizzato, riceve nutrimento per diffusione dal derma tramite la giunzione dermo-epidermica, una membrana che regola gli scambi tra le due regioni e ne permette una migliore aderenza.

L'epidermide è un epitelio squamoso stratificato, spesso in media 0.2 mm, in continuo rinnovamento, costituito da quattro tipi di cellule: i cheratinociti, i melanociti, le cellule di Langherans e le cellule di Merkel.

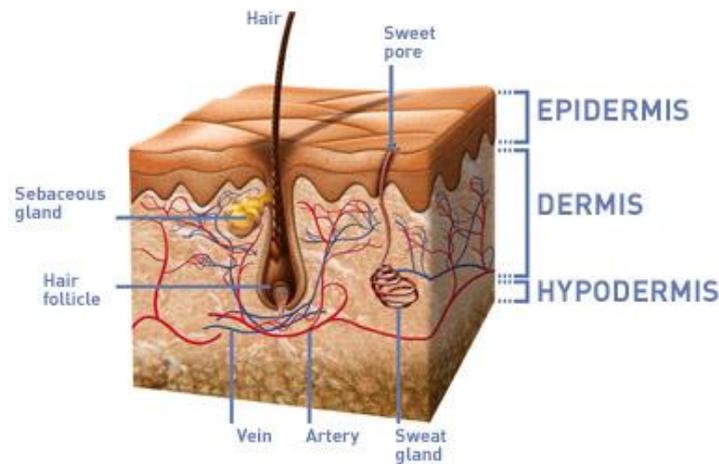


Fig. 2. 1: La struttura anatomica della cute.

I cheratinociti sono i principali costituenti dell'epidermide dove proliferano continuamente mediante la replicazione delle cellule dello strato basale a contatto con il derma sottostante. Danno origine allo strato corneo, uno strato di spessore variabile che risulta più spesso in regioni sottoposte ad attrito o pressione, come il palmo della mano e la pianta del piede, dove raggiunge uno spessore di 1.5 mm.

La differenziazione è un processo complesso: da una cellula staminale situata in profondità si ottiene una cellula disposta sulla superficie corporea. Nel citoplasma si accumulano i filamenti di cheratina, una proteina insolubile sintetizzata dai cheratinociti, che poi, tramite cambiamenti di morfologia, si trasformano in lamine appiattite: il processo è detto cheratinizzazione. Le cellule, una volta raggiunta la superficie, muoiono e si staccano. Il tempo che impiegano i cheratinociti per compiere questo ciclo è di circa 28 giorni e il processo è favorito dalle citochine. Gli stessi cheratinociti sono in grado di produrre fattori di crescita e quindi di agire da autoregolatori. Tale attività risulta di particolare importanza durante lo sviluppo di tumori e durante i processi fisiologici di riparazione delle ferite. Nell'epitelio sano i fenomeni di desquamazione e riproduzione cheratinocitaria sono in perfetto equilibrio.

La distinzione dei quattro differenti strati epidermici si basa proprio sul grado di maturazione dei cheratinociti: nel dettaglio, procedendo dallo strato infimo a quello superficiale, si trovano rispettivamente strato basale, spinoso, granuloso e corneo [Fig. 2.2].

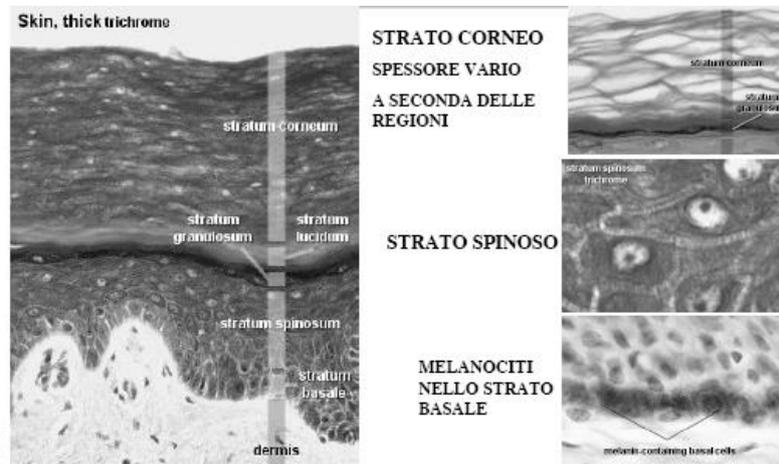


Fig. 2.2: La stratificazione dell'epidermide.

Lo strato basale, adiacente al derma, contiene cheratinociti allo stato iniziale del processo di differenziazione e in esso si accumulano i melanociti, sintetizzatori della melanina, un pigmento che conferisce il colore alla pelle e che, assorbendo l'energia radiante, protegge i tessuti dai raggi solari che altrimenti risulterebbero dannosi. Le cellule di Merkel si trovano nello strato basale in corrispondenza di particolari zone come labbra e cavità orali dove assolvono a ruoli sensoriali ed endocrini. Nello strato spinoso hanno luogo le interconnessioni, tramite i desmosomi, tra i cheratinociti differenziati che proseguono poi il loro cammino verso la superficie esterna attraversando lo strato granuloso. Le cellule di Langherans, in buona parte situate nello strato spinoso, svolgono funzione immunologica in quanto potenti stimolatori delle cellule T, le cellule iniziatrici della risposta immunitaria nei confronti degli antigeni endogeni ed esogeni, e responsabili della fagocitosi. Trattandosi di cellule che partecipano alla difesa immunitaria cutanea, il loro danneggiamento a causa di lesioni può avere gravi conseguenze per l'organismo. Nello strato corneo i cheratinociti giungono a maturazione e si trasformano in corneociti, cellule in grado di assorbire quantitativi d'acqua tre volte superiori al proprio peso, eliminate poi tramite la desquamazione.

L'epidermide provvede anche alla produzione degli annessi cutanei e presenta un'elevata capacità di rigenerazione dei propri elementi cellulari sia dopo un loro episodico danneggiamento, sia a seguito della loro continua desquamazione fisiologica. Tuttavia questo turn over continuo rallenta con l'avanzare dell'età della persona, aspetto connesso ad una minor presenza di cellule staminali. Si pensi che il processo di cheratinizzazione descritto impiega, in un individuo anziano, circa 15 giorni in più per essere portato a termine, 40-45 rispetto ai normali 28 giorni.

Il derma è costituito da una sostanza amorfa con funzione cementante in cui sono immerse, in varia misura, cellule e fibre connettivali. Si tratta di uno strato per lo più acellulare di tessuto connettivo fibroso, dello spessore variabile da 0.6 a 3 mm, caratterizzato principalmente da fibre di elastina, che assicurano la giusta elasticità alla cute e da fibre di collagene, con ruolo di sostegno e resistenza. Il collagene è l'elemento strutturale principale del derma di cui costituisce circa il 70% e si dispone a livello più esterno, nello strato detto papillare, in modo da formare una fine trama di fibre intrecciate, mentre nello strato più profondo, lo strato reticolare, forma spessi fasci. La parte superiore del derma, adiacente all'epidermide contiene fibre di collagene vagamente arrangiate. Alcune di queste papille dermiche contengono terminazioni nervose e capillari che raggiungono anche gli strati più profondi dell'epitelio, dove portano nutrimento e consentono l'eliminazione dei prodotti di scarto del metabolismo. Il derma reticolare è caratterizzato invece da tessuto connettivo denso irregolare con prevalenza di fibre di collagene ed elastina, componente che garantisce flessibilità alla cute.

La componente amorfa riempie gli spazi tra la componente fibrillare e quella cellulare del derma ed è composta da mucopolisaccaridi, proteine plasmatiche, acido ialuronico, elettroliti e acqua. I proteoglicani donano viscosità e idratazione alla pelle. Queste numerose macromolecole che conferiscono al derma proprietà difensive e rigenerative sono secrete dai fibroblasti.

L'ipoderma è la struttura più intima, direttamente a contatto con il derma, da un lato, e con i tessuti adiposi, dall'altro. Questo strato è costituito soprattutto da tessuto connettivo ed è particolarmente ricco di adipociti, le cellule preposte alla biosintesi dei grassi. Grazie alla presenza di questa tipologia cellulare, il tessuto funge da riserva energetica e, nel contempo, da isolante termico.

Nell'ipoderma hanno origine i follicoli piliferi e le ghiandole sudoripare che ricevono nutrimento e cedono i loro prodotti di scarto.

Il derma contiene un numero enorme di strutture specializzate tra cui una fitta rete di vasi sanguigni con funzione nutritiva, nervi e recettori sensoriali che raccolgono gli stimoli tattili esercitati sulla pelle e li trasmettono poi al cervello.

Le ghiandole sudoripare, localizzate nel derma, sono numerose oltre che nel cavo ascellare anche sul palmo delle mani e sulla pianta del piede, dove secernono il sudore, costituito da acqua, sali minerali e urea, con il compito di espellere dall'organismo una parte delle tossine e regolare la temperatura corporea, evaporando qualora fosse necessario. Esse inoltre si dirigono in profondità tra le papille portando alla formazione di rilievi che sporgono nel derma in modo da aumentare ulteriormente la stabilità dell'interfaccia dermo-epidermica.

Le ghiandole sebacee derivano dalle cellule dell'epidermide e producono il sebo, una secrezione a base di lipidi che mantiene la pelle elastica e tonificata, e svolge una funzione antibatterica. Risultano funzionali anche per la protezione dalle radiazioni ultraviolette e per il trasporto di antiossidanti in superficie.

I follicoli piliferi ricoprono quasi interamente la superficie corporea, sebbene vi siano zone caratterizzate da maggior densità, e fungono anch'essi da barriera fisica e da indicatori della temperatura corporea.

3. ELEMENTI CHIAVE DELL'INGEGNERIA TESSUTALE

Per ottenere dei costrutti che si avvicinino il più possibile all'originale architettura e funzionalità della pelle è necessario analizzare l'interconnessione tra tre elementi che vengono considerati chiave per ogni tipologia di tessuto ingegnerizzato, indipendentemente dall'organo che vanno a sostituire: le cellule, lo scaffold che funge da supporto e, non meno importanti, i fattori di crescita che favoriscono il differenziamento cellulare e la loro funzionalizzazione.

In seguito si analizza ciascun costituente di un tessuto ingegnerizzato con lo scopo di discutere vantaggi e svantaggi di determinate scelte progettuali. Questa valutazione preliminare è indispensabile per poter entrare nel dettaglio del progetto di cute ingegnerizzata, in cui ciascun elemento interagisce con l'altro per dar luogo ad un neo-tessuto funzionale.

3.1 LE CELLULE

Il primo passo nello sviluppo di tessuti ingegnerizzati è quello di identificare una fonte cellulare e di capire il meccanismo attraverso il quale le cellule appartenenti a tale insieme possono funzionare e interagire, tra loro e con altre linee cellulari, in maniera opportuna.

Il nostro organismo fornisce sostanzialmente due grandi categorie di cellule: somatiche e staminali [Tabella 3.1.1]. Si considerino dapprima le cellule somatiche, fonti cellulari utilizzate fin dai primi sviluppi di sistemi per la riparazione dei tessuti: le cellule autologhe ed eterologhe.

Le cellule autologhe presentano lo svantaggio rilevante di dover essere prelevate, tramite biopsia, dal paziente che, nella maggioranza dei casi, si trova già in uno stato critico, e, in seguito, essere poste in coltura. Oltre al disagio per il paziente e alla difficoltà di sopperire alla quantità di tessuto necessaria alla sostituzione della porzione mancante, questo procedimento, spesso, richiede troppo tempo.

La linea cellulare allogenica, invece, ha rappresentato una valida alternativa per diversi anni, trattandosi di una fonte rapidamente accessibile e conservabile nelle cosiddette Banche dei Tessuti. In tal caso le cellule, prelevate da cadaveri, devono essere opportunamente trattate per poter essere conservate e per ridurre il più possibile il rischio di rigetto dell'impianto su cui vengono seminate, una volta che

questo entra in contatto con l'ambiente biologico. Risulta utile ricordare, infatti, che tutto ciò che non appartiene ad un individuo viene riconosciuto dall'organismo come 'non-self' e aggredito da questo. Tale inconveniente, connesso al pericolo di incorrere nella trasmissione di malattie, ne ha ridotto l'utilizzo.

Tabella 3.1. 1: Linee cellulari.

Somatic cells	Autologous fibroblasts/keratinocytes	Little risk of rejection; reliable applications	Longer time required to expand; not accessible or not in sufficient numbers sometimes
	Allogeneic fibroblasts/keratinocytes	Readily accessible; can be preserved for applications	Potential problems of rejection and disease transfer
Stem cells	Adipose-derived stem/stromal cells (ASCs)	Abundant and readily accessible; contribute to the production of hypodermis	Vary in metabolic activity; proliferation and differentiation depending on the location of the tissue depot and the age and gender of the patient
	Hair follicle stem cells	Higher proliferative capacity; contribute to the production of epidermis and skin appendages	Not accessible or not in sufficient numbers sometimes
	Epidermal stem cells/Dermal stem cells	Contribute to the production of skin and skin appendages	Not in sufficient numbers; absence of a controlled, efficient and reproducible differentiated manner
	Mesenchymal stem cells (MSC)	Relatively easy to obtain and readily expanded; capable of differentiating into various tissues and cells	Absence of a controlled, efficient and reproducible differentiated manner
	Embryonic stem cell (ESC)	Totipotent; capable of differentiating into various tissues and cells	Ethical and moral objections
	Differentiated epidermal cells	Potential reversion to undifferentiated stem cells	Relevant mechanism remains unclear
	Induced pluripotent stem (iPS) cells	Avoiding immunological rejection and current ethical dilemmas surrounding human ESC	Viral vectors required; lower efficiency

Entrambe le linee cellulari analizzate finora si riferiscono a semplici colture di fibroblasti e cheratinociti, che rappresentano certamente la base per derma ed epidermide, ma che non sono sufficienti a ricoprire i numerosi ruoli della pelle, che si è visto essere formata da diverse tipologie cellulari e svolgere variegati compiti.

Le cellule staminali, indipendentemente dal tipo, sono cellule capaci di dividersi in coltura per periodi indefiniti di tempo e di differenziarsi generando cellule specializzate nello svolgere un determinato compito.

Le cellule staminali multipotenti locali sono situate principalmente nel tessuto adiposo e nel rigonfiamento follicolo pilifero. Vi si accede facilmente tramite lipoaspirazione, una procedura poco invasiva. Attualmente i follicoli piliferi

derivanti da cellule staminali sono ottimi candidati da seminare nei sostituti cutanei in quanto la loro incorporazione promuove la formazione di una rete di collegamenti nervosi. Essi potrebbero inoltre migliorare il ripristino del senso del tatto, trattandosi di recettori sensoriali [5].

Le staminali ematopoietiche sono una popolazione cellulare situata nel sangue o nel midollo osseo, danno origine alla frazione corpuscolare del sangue e alle cellule somatiche, quali osteoblasti e fibroblasti. Le cellule staminali mesenchimali (MSCs), ad esempio, vengono utilizzate in ambito biomedico: esse possono accelerare il processo di guarigione intervenendo nel meccanismo infiammatorio, promuovendo la formazione di una matrice vascolarizzata, incoraggiando la migrazione dei cheratinociti e inibendo l'apoptosi delle cellule preposte alla riparazione delle ferite. E' stato inoltre dimostrato in letteratura che la combinazione di MSCs con microsferi ingegnerizzate a base di EGF è in grado di riparare le ghiandole sudoripare e promuovere la guarigione della ferita a seguito di una lesione cutanea. [6].

Le cellule progenitrici, come le cellule staminali embrionali (ESCs), sono totipotenti, ovvero la loro differenziazione può portare alla formazione di tutte le tipologie di tessuto. La cura del paziente con le cellule embrionali evita l'effetto di rigetto, sebbene il loro utilizzo dia adito ad una serie di obiezioni etiche e morali tali per cui in Italia il loro impiego è vietato. Inoltre si è visto, tramite esperimenti sui topi, che proprio per le loro grandi potenzialità possono dare vita anche a cellule tumorali. Le cellule staminali pluripotenti indotte (iPS), ovvero generate da cellule somatiche tramite manipolazione genetica, rappresentano una strategia per eliminare la possibilità di rigetto e superare i problemi di ordine etico riguardanti le ESCs. Esse, infatti, a differenza delle cellule totipotenti, non sono in grado di dare origine all'embrione [7].

Sebbene le cellule staminali adulte rappresentino un'alternativa all'uso di staminali derivanti da embrioni o da tessuti fetali umani, vi sono delle forti limitazioni nell'utilizzo di questa linea cellulare dovute principalmente alla scarsa presenza nell'adulto di queste cellule che, oltretutto, si riducono in numero con il progredire dell'età, alla ridotta capacità proliferativa e quindi ai tempi di crescita in coltura troppo lunghi nel caso di malattie a decorso rapido, e alla difficoltà di isolamento e purificazione.

Le cellule staminali di derma ed epidermide contribuiscono al mantenimento dell'omeostasi, alla rigenerazione dei follicoli nella pelle adulta e, allo stesso tempo, alla riparazione delle ferite. Nell'epidermide il costante turnover cellulare deriva dalla presenza, nello strato basale, di una popolazione di cellule staminali di cheratinociti, dotate di alta capacità di rinnovamento e caratterizzate da un grande potenziale proliferativo.

3.2 SCAFFOLD

Lo scaffold è una matrice tridimensionale che funge da supporto per le cellule che sono ancoraggio-dipendenti, ovvero assolvono al loro compito solo dopo avere aderito ad un substrato. Le cellule isolate mancano della capacità di mantenere l'architettura del tessuto perché non hanno un supporto che le guida. Inoltre, utilizzando una tale struttura, è sufficiente prelevare poche cellule per coprire delle superfici lese anche molto vaste, aspetto rilevante soprattutto se si tratta del prelievo di cellule autologhe. Lo scaffold, oltre a fungere da mero supporto, deve essere in grado di far accrescere e differenziare le cellule che vengono fatte aderire, e deve rispondere a determinate caratteristiche meccaniche, variabili a seconda del tessuto che si vuole rigenerare. Lo scopo principale è quello di creare un supporto che somigli il più possibile alla matrice extra-cellulare, il supporto naturale. Infatti si ritiene che un aumento della somiglianza del tessuto ingegnerizzato con il tessuto nativo porti alla generazione di un fenotipo che ricalca quello della pelle naturale e ad un conseguente incremento del processo di guarigione.

La ECM è una struttura porosa complessa costituita da materiale gelatinoso e viscoso. E' formata da un intreccio di eteropolisaccaridi e di proteine fibrose nel quale vengono trattenute quantità rilevanti di liquido interstiziale, in particolar modo d'acqua. La trama di fibre funge da supporto e protezione per le cellule che possono così mantenere intatta la loro forma. I pori consentono poi la diffusione da e verso le singole cellule di nutrienti, prodotti del metabolismo e ossigeno. Al ruolo strutturale si affianca un compito attivo, nella trasmissione del segnale: la matrice, infatti, regola lo sviluppo, la migrazione, la proliferazione, la forma e la funzione delle cellule a stretto contatto con essa.

Il supporto che si ottiene per via sintetica può contenere sia componenti naturali, quali polipeptidi, idrossiapatite, acido ialuronico, glicosamminoglicani (GAGs), fibronectina, collagene, sia sintetiche, quali acido poliglicolico, acido polilattico, completamente biodegradabili, o il poliuretano (PUR), sostanza non degradabile frequentemente utilizzata. I materiali naturali mostrano bassa tossicità e minima risposta infiammatoria, aspetti dovuti alla loro abbondante presenza nella pelle. D'altra parte, la complessità degli stimoli che questi producono non consente di avere pieno controllo sullo sviluppo e sulla differenziazione cellulare. Inoltre le scarse prestazioni meccaniche ne hanno limitato l'uso per la produzione degli scaffold.

Nei substrati sintetici, invece, risulta fondamentale la funzionalizzazione biochimica, ovvero il processo tramite il quale si arricchisce la matrice di fattori di crescita e di adesione che dirigono la neo-formazione del tessuto, in modo da creare un supporto caratterizzato non solo da un ruolo passivo di sostegno cellulare, ma anche da uno attivo nella trasmissione del segnale.

3.2.1 PROPRIETA'

Lo scaffold ideale è in grado di stimolare l'adesione, la proliferazione e il differenziamento cellulare, favorendo così la rigenerazione e l'integrazione nel tessuto preesistente [Tabella 3.2.1. 1].

Tabella 3.2.1. 2: Proprietà dei supporti dermici e requisiti fisici ad essi associati.

Wound protection
Fluid barrier
Antibacterial properties
Cell recruitment
Appropriate pore size
Scaffold degradability
Integrin binding sites
Scaffold/graft survival
Scaffold vascularization
Minimize foreign body response
Scaffolding function
Provide a template for neodermis formation
Reduce myofibroblast differentiation
Provide niches for stem cell differentiation
Timely scaffold degradation
Practical considerations for the clinic
Ease of handling
Tear resistance
Sterility

Nella progettazione degli scaffold bisogna prendere in considerazione diversi aspetti: prima di tutto, in virtù del fatto che il supporto viene a diretto contatto con l'ambiente biologico, deve risultare biocompatibile in modo da non provocare una risposta indesiderata dell'organismo una volta impiantato.

Uno degli obiettivi dell'ingegneria tissutale è fare in modo che l'organismo riprenda a svolgere le proprie funzioni autonomamente. Per questo motivo spesso si richiede che il substrato sia biodegradabile, ovvero una volta terminata la propria azione venga eliminato dall'organismo, senza lasciare traccia, con una cinetica ben precisa, parametro critico nella progettazione di questi scaffold temporanei. Il riassorbimento, infatti, deve procedere simultaneamente alla crescita cellulare del tessuto: una cinetica veloce non permetterebbe al tessuto di formarsi, mentre una degradazione troppo lenta ne ostacolerebbe la neoformazione. Durante la degradazione del supporto, inoltre, non devono essere immesse nell'organismo sostanze tossiche, bensì il substrato deve essere eliminato dall'ambiente biologico senza nuocere. Lo scaffold, proprio per lo scopo per cui è stato fabbricato, deve possedere proprietà meccaniche appropriate, che non sono univocamente determinate, ma dipendono dal sito in cui questo viene inserito. Ulteriori fattori da considerare in sede di progettazione sono il materiale da utilizzare, la porosità e la topologia superficiale, in particolare la rugosità: da questi parametri dipende la possibilità che il sostituto neo-impiantato venga vascolarizzato ed eventualmente innervato. Il grado di porosità varia in relazione all'applicazione di interesse e garantisce lo scambio di nutrienti tra il supporto e l'ambiente biologico, mantenendo le cellule in vita. Tuttavia la presenza di pori ed interconnessioni incide significativamente sull'integrità meccanica della struttura in quanto rappresentanti di zone in cui gli sforzi tensionali sono molto accentuati. Si rivela dunque necessario trovare un *'trade off'* fra la porosità e la funzione biologica che si vuole ottenere.

3.2.2 TECNICHE DI FABBRICAZIONE

La fabbricazione dello scaffold è uno degli aspetti più critici nel campo dell'ingegneria tissutale in quanto il successo terapeutico è direttamente proporzionale alla bontà del supporto sul quale vengono fatte aderire le cellule.

Vengono analizzate in seguito alcune tecniche di realizzazione che rappresentano gli sviluppi più interessanti in questo settore.

3.2.2.1 ELECTROSPINNING (ES)

Questa tecnica, denominata anche elettrofilatura, permette di produrre nano-fibre, dal diametro dell'ordine dei 100 nm, strutturalmente simili al collagene nativo, modellando così la struttura del tessuto originario. La tecnica è applicabile ai materiali polimerici che possono essere portati ad uno stato fluido di elevata viscosità attraverso la fusione, ottenuta col calore, o attraverso la dissoluzione in opportuni solventi. Quest'ultima è più diffusa visti i minori costi e la maggior facilità di produzione.

In linea di principio l'ES consiste nell'estrusione delle fibre mediante l'applicazione di una differenza di potenziale tra la siringa, contenente la soluzione polimerica da elettrofilare, ed il collettore, uno schermo scaricato a terra, solitamente realizzato con materiale metallico, su cui si andranno a depositare le fibre [Fig. 3.2.2.1.1].

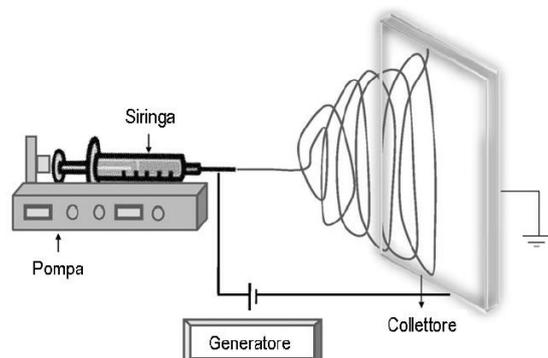


Fig. 3.2.2.1. 1: Schema dell'apparecchiatura per electrospinning.

Il collettore può essere di geometria piana, nel qual caso la deposizione avviene sotto forma di fibre non intrecciate disposte in maniera casuale, o cilindrica, se lo scopo è quello di ottenere delle fibre allineate. Il campo elettrico applicato deve essere sufficientemente elevato da vincere le tensioni superficiali e gli sforzi viscosi della soluzione. Alcuni parametri che governano l'electrospinning, e di conseguenza il diametro delle fibre e la loro riproducibilità, sono la forza del campo elettrico applicato, la concentrazione del polimero in soluzione e la distanza tra la punta della siringa e il target [8]. Aumentando il campo elettrico applicato il

getto polimerico viene maggiormente stirato e si producono così fibre il cui diametro risulta inferiore. Dunque si può agire su tali parametri per dirigere la morfologia dei nanofilamenti ed evitare la formazione di gocce, difetto ricorrente in tale tecnica. Cricche ed imperfezioni, infatti, danno luogo ad un materiale non perfettamente omogeneo, caratterizzato da proprietà fisiche anche molto variabili da zona a zona. In prossimità delle imperfezioni compaiono sollecitazioni meccaniche molto rilevanti che potrebbero portare il materiale a rottura anche in corrispondenza di valori di tensione inferiori a quelli considerati limite.

Nel settore biomedicale vengono prodotte con questa tecnologia le bende per la cura e la protezione di ferite e bruciature, ed i supporti per la crescita cellulare [9]. L'architettura dello scaffold, come detto, influenza l'adesione e la proliferazione cellulare. In particolare la dimensione delle fibre che si ottengono tramite electrospinning è paragonabile a quella delle fibrille della ECM; per questo le fibre sono in grado di mimare l'ambiente extracellulare e supportare la crescita di un tessuto tridimensionale [Fig. 3.2.2.1.2]. Il calibro delle fibre che si possono ottenere con il processo consente di produrre materiali caratterizzati da un altissimo rapporto superficie/volume e da un'elevata porosità. Pori di dimensioni troppo ridotte darebbero luogo ad un tessuto bidimensionale che non rispecchierebbe l'effettiva realtà biologica.

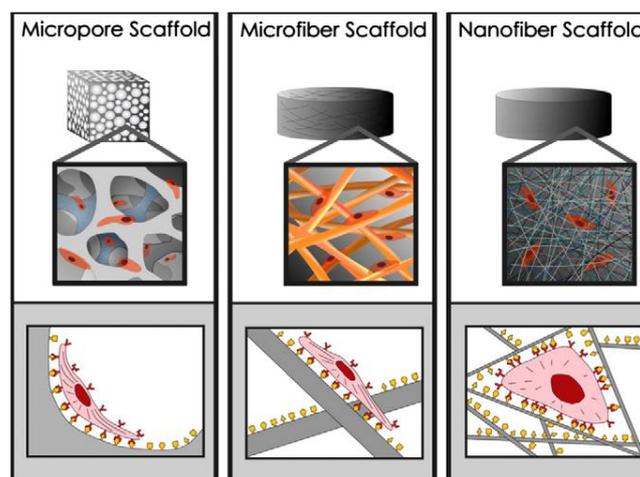


Fig. 3.2.2.1. 2: Adesione cellulare su supporti morfologicamente diversi.

La struttura tridimensionale realizzata con nanofibre presenta elevata biodegradabilità, mostra requisiti di impermeabilità ed emostaticità e può essere

utilizzata per la veicolazione di farmaci. E' in grado di creare un effetto barriera contro la minaccia dei batteri esterni in quanto le dimensioni delle fibre prodotte non sono comparabili con quelle dei batteri, il cui passaggio viene quindi impedito, pur rimanendo leciti gli scambi di nutrienti e gas quali O₂, CO₂ e vapore acqueo. Un'appropriata scelta del polimero rende il costrutto citocompatibile e adatto alla riproduzione dei cheratinociti e dei fibroblasti.

Essendo noto che le cellule, dopo aver attraversato il dispositivo, rimangono in vita, si possono creare dei supporti pre-popolati che generano una distribuzione omogenea delle cellule incrementandone anche la migrazione [10]. Si permette inoltre l'incapsulamento di piccole particelle insolubili, quali farmaci o fattori di crescita, all'interno delle nanofibre stesse. L'electrospinning, infine, può essere sfruttato per ricoprire fibre sintetiche con materiale biologico, ottenendo così una struttura interna sintetica, dalle proprietà meccaniche controllabili, circondata da un involucro naturale, che risulta completamente biocompatibile.

3.2.2.2 SELF-ASSEMBLING PEPTIDES (SAP)

Tra gli scaffold potenzialmente in grado di soddisfare le proprietà discusse vi sono quelli composti dai peptidi auto-assemblanti, ovvero molecole in grado di organizzarsi spontaneamente, sotto opportune condizioni, in strutture tridimensionali stabili, tramite l'instaurarsi di legami chimici di natura non covalente, come legami ionici, legami a ponte d'idrogeno, interazioni idrofobiche e forze di Van der Waals.

Esempio di self-assembling presente in natura è quello dei fosfolipidi della membrana cellulare che si dispongono autonomamente, a contatto con l'acqua, orientando le teste polari idrofiliche all'esterno e le code apolari verso l'interno a formare una struttura a doppio strato tenuta insieme da legami di tipo idrofobico.

Sebbene il fenomeno sia noto da decenni, l'utilizzo per la progettazione di scaffold risale agli anni '90, con la scoperta, avvenuta ad opera di Zhang et al. [11], dei peptidi ionico-covalenti, una categoria particolare di molecole auto-assemblanti.

Per capire se il peptide si dispone autonomamente si deve guardare alla natura dei singoli amminoacidi che lo costituiscono e anche alla struttura primaria, ovvero alla loro posizione nella sequenza. In particolare i peptidi devono essere complementari, ovvero la distribuzione di carica all'interno della sequenza deve

ripetersi, e compatibili dal punto di vista strutturale. I peptidi ionico-covalenti rispondono ad entrambe le esigenze in quanto caratterizzati dall'alternanza di residui positivi e negativi che generano una sequenza ordinata di cariche interagenti. Si vengono a formare nanofibre 5000 volte più piccole di un capello umano, che, grazie al cambio di acidità della soluzione in cui si trovano disciolti, danno luogo a gel una volta iniettate nell'organismo. E' possibile, tramite l'inserimento di motivi funzionali, produrre SAP ad hoc per il tessuto da rigenerare con costi abbastanza contenuti. I peptidi, in quanto tali, sono ben tollerati dall'organismo, ma si deve prestare attenzione agli enzimi proteolitici che, così come scindono le proteine durante i naturali processi metabolici, possono fare altrettanto con i peptidi utilizzati per promuovere l'adesione. Si deve quindi fare in modo che questi enzimi non vengano a trovarsi in prossimità dello scaffold nel mentre in cui i peptidi esplicano la loro funzione.

Il self-assembling viene già sfruttato per diverse applicazioni in ambito biomedico, dove, per la rigenerazione dei tessuti biologici, il più utilizzato è il RADA16.

Uno studio sull'utilizzo dei peptidi auto-assemblanti, in particolare del RADA16, per creare cute ingegnerizzata in vitro è stato compiuto da Kao et al. [12]. Venne appunto sfruttato un peptide sintetico costituito da amminoacidi caratterizzati dalla ripetizione di Arginina, Acido Aspartico e Alanina (RADA16) per produrre un equivalente cutaneo caratterizzato dalla presenza di fibroblasti e cheratinociti di neonato. I fibroblasti aggregarono soprattutto sulla superficie dell'idrogel, ma non si distribuirono in maniera uniforme e si osservò, durante il periodo di coltura, una riduzione della sezione dell'equivalente dermico che non si seppe se attribuire o meno alla contrazione mediata dai fibroblasti. A seguito della colonizzazione da parte dei fibroblasti della superficie di idrogel si fece aderire lo strato epidermico di cheratinociti. L'equivalente dermo-epidermico risultante non era ben ancorato al costrutto e mancava della laminina, componente importante della membrana basale. Non sono stati pubblicati studi in vivo; i risultati in vitro suggeriscono la necessità di affinare la tecnica prima di poterla applicare in ambito clinico.

Spesso gli idrogeli auto-assemblanti vengono impiegati come ricoprimento per le ferite piuttosto che come sostituti veri e propri del derma in virtù delle loro buone proprietà emostatiche. Supporti di peptidi auto-assemblanti, infatti, promuovono l'adesione delle cellule endoteliali. In seguito all'adesione le cellule vengono

attivate e producono una struttura completamente analoga a quella che si otterrebbe facendo crescere le cellule su un gel fibrinico o su collagene in presenza di fattori di crescita, quali il fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF) e il fattore di crescita dei fibroblasti (b-FGF).

3.2.2.3 SOLID FREEFORM FABBRICATION (SFF)

La *Solid Free Form Fabrication* è un metodo in cui lo scaffold tridimensionale prende vita da strati distinti, depositati attraverso una delle molteplici tecniche computerizzate di irrorazione o stampaggio, basate su sistemi CAD. Gli aspetti tecnici vanno oltre lo scopo di questo elaborato. La procedura consente la deposizione delle cellule con un livello di controllo e precisione non raggiungibile con approcci quali l'elettrospinning, ma i costi di fabbricazione sono piuttosto elevati.

Recentemente è stato pubblicato uno studio che sfrutta la SFF per produrre cute ingegnerizzata. Lee et al. [13] usarono il metodo di stampaggio per costruire un sostituto cutaneo servendosi di un idrogel di collagene, come materiale di supporto. I fibroblasti furono stampati nella zona dello scaffold prossima al letto della ferita, mentre i cheratinociti furono incorporati nella zona distale. Sebbene nell'esperimento si faccia riferimento a due soli tipi cellulari, si possono facilmente aggiungere altre strutture più complesse usando differenti materiali per lo scaffold. L'incorporazione di canali preformati per i vasi sanguigni in cui seminare cellule endoteliali o staminali, ad esempio, viene impiegata ai fini di una più rapida ed efficace vascolarizzazione. La deposizione dell'equivalente cutaneo può avvenire in situ, in modo da ricalcare perfettamente la forma della parte del corpo lesa, permettendone una maggiore aderenza.

3.3 FATTORI DI CRESCITA

La rigenerazione del tessuto è un processo dinamico durante il quale le cellule ricevono e trasmettono complessi pattern di segnali molecolari che comandano una serie di eventi metabolici i quali, combinandosi, controllano la proliferazione e la differenziazione cellulare, consentendo il corretto sviluppo del tessuto. I fattori di crescita sono proteine che si legano ad opportuni recettori cellulari con il

risultato di attivare questi processi. Vi sono fattori di crescita versatili ed altri di tipo specifico, ovvero attivi solo nei confronti di un particolare tipo di cellule.

Gli sforzi dell'ingegneria tissutale si sono concentrati sulla costituzione di scaffold arricchiti con fattori di crescita, come il fattore di crescita dei fibroblasti e il fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF) in modo da aumentare la bioattività del polimero e accelerare notevolmente il processo di guarigione. Si desidera inoltre che il rilascio di queste molecole biologiche all'interno del supporto avvenga in maniera controllata. I materiali biomimetici, anche detti, in maniera poco appropriata, 'intelligenti', promuovono specifiche risposte cellulari in grado di dirigere la formazione di nuovo tessuto; la promozione avviene grazie alla presenza, sulla superficie dell'impianto o al suo interno, di proteine che guidano appunto l'adesione e la crescita cellulari. L'impiego clinico di proteine biologicamente attive, tuttavia, è reso difficile dal potenziale rischio di denaturazione delle proteine stesse che perdono l'integrità della loro struttura terziaria e quindi si inibiscono, dai costi elevati e dalla disponibilità limitata.

I fattori di crescita possono essere aggiunti direttamente al polimero in soluzione, usato per la fabbricazione del supporto, oppure lo scaffold può essere modificato in un secondo momento sfruttando particolari tecniche di ricoprimento.

Vi sono diverse metodiche per portare la proteina sulla superficie del materiale: l'adsorbimento, il rilascio da coating e l'immobilizzazione. Il primo si realizza semplicemente lasciando a contatto la superficie da funzionalizzare con una soluzione della biomolecola per un tempo prestabilito. Sebbene la tecnica sia poco costosa, essa potrebbe portare alla denaturazione delle proteine con conseguente perdita del loro ruolo biologico; inoltre, trattandosi di una deposizione non controllata, l'orientamento molecolare potrebbe essere tale da non consentire l'interazione ligando-recettore.

In alternativa all'adsorbimento la proteina viene legata ad un materiale, il carrier, generalmente polimerico come acido ialuronico, acido polilattico o acido poliglicolico, che ne consente il trasporto e il rilascio controllato. Carrier e biomolecola possono essere legati chimicamente o inglobati l'uno nell'altro. Naturalmente il carrier deve essere biocompatibile, bioriassorbibile e biodegradabile in modo da non compromettere l'attività proteica.

Un metodo più complesso è costituito dall'immobilizzazione covalente del peptide sulla superficie dell'impianto. Tecnologie recenti suggeriscono lo sviluppo di nanosfere fissate sulla faccia porosa di scaffold fibrosi che permettono il rilascio controllato, sia dal punto di vista spaziale che temporale, dei fattori di crescita. Il controllo avviene agendo su diverse formulazioni delle nanosfere.

I principali fattori di crescita coinvolti nei vari stadi del processo di guarigione sono raggruppati nella sottostante tabella [Tabella 3.3.1].

Tabella 3.3. 1: Fattori di crescita.

Growth factor	Function involved in wound healing
bFGF	Proliferation of fibroblasts and epithelial cells; matrix deposition; wound contraction; angiogenesis; accelerates formation of granulation tissue
VEGF	Stimulates angiogenesis in granulation tissue; improves formation of collateral blood vessels in peripheral vascular disease
EGF	Differentiation, proliferation, migration and adhesion of keratinocytes
PDGF	Mitogenic for smooth muscle cells, endothelial cells and fibroblasts
TGF- β	Mitogenic for fibroblasts and smooth muscle cells; chemotactic for macrophages; stimulates angiogenesis (indirect) and collagen metabolism
TGF- α	Stimulates proliferation of epithelial cells and fibroblast; formation of granulation tissue
IL-1	Neutrophil chemotaxis; fibroblast proliferation
TNF	Fibroblast proliferation
HGF	Re-epithelialisation; neovascularisation; formation of granulation tissue
IGF-1	Fibroblast proliferation
G-CSF	Stimulates production of neutrophils; enhances function of neutrophils and monocytes; promotes proliferation of keratinocytes
GM-CSF	Mediates proliferation of epidermal cells

bFGF, basic fibroblast growth factors; VEGF, vascular endothelial growth factor; EGF, epidermal growth factor; PDGF, platelet-derived growth factor; TGF- β , transforming growth factor- β ; TGF- α , transforming growth factor- α ; IL-1, interleukin-1; TNF, tumour necrosis factor; HGF, hepatocyte growth factor; IGF-1, insulin-like growth factor-1; G-CSF, granulocyte-colony stimulating factor; GM-CSF, granulocyte macrophage-colony stimulating factor.

3.4 FATTORI DI ADESIONE

L'adesione cellulare al supporto è un processo fondamentale per la formazione e il mantenimento della struttura tridimensionale dei tessuti. Dal punto di vista chimico l'adesione cellula-matrice si realizza attraverso interazioni specifiche e selettive tra le proteine presenti sulla membrana cellulare e le proteine dell'ECM. Uno dei peptidi di adesione più studiati è il motivo RGD (arginina-glicina-acido aspartico), un peptide ubiquitario che si riscontra anche nella fibronectina e nella laminina. La fibronectina è una lunga molecola che si trova sotto forma di dimero, con le due subunità tenute insieme da un ponte disolfuro. Ciascuna catena

presenta quattro domini che si ripetono e il sito specifico per l'interazione con l'integrina, ancorata alla superficie della cellula, appare proprio in corrispondenza del motivo RGD. Assolvono al medesimo compito anche altre proteine, quali laminina e tenascina C.

Lo studio dell'adesione del sostituto cutaneo al letto della ferita è importante nella progettazione di innesti in quanto qualora questa fosse scarsa o assente si assisterebbe alla formazione di vesciche e bolle nel sito danneggiato, fattori che impediscono una corretta neo-morfogenesi del tessuto.

4. SOSTITUTI CUTANEI

Sebbene una ferita cutanea guarisca il più delle volte spontaneamente, in taluni casi, in presenza di estese regioni danneggiate, non si può attendere il tempo fisiologico necessario per la guarigione o una riparazione autonoma non avverrebbe proprio. Inizialmente gli equivalenti cutanei erano composti da sole lamine di cheratinociti coltivati; in seguito si dimostrò che l'inclusione di uno scaffold che agisse come tessuto connettivo di sostegno migliorava la resistenza meccanica, riduceva la formazione di cicatrici e soprattutto favoriva la proliferazione delle cellule staminali in vivo e in vitro. La pelle ingegnerizzata rappresenta una valida alternativa ad allo- ed auto-trapianti, che sopperisce alle problematiche connesse al dolore, alle possibili complicanze sistemiche e alla disponibilità limitata di materiale asportabile dall'uomo, riducendo inoltre il rischio di trasmissione delle malattie. Altro vantaggio dei tessuti ingegnerizzati è che sono disponibili repentinamente e in quantità maggiori trattandosi di costrutti il più delle volte congelati o a cui si ha accesso immediato (*off-the-shelf availability*).

Il ricoprimento di una ferita o di una lesione cutanea con pelle o con un suo sostituto evita la perdita dei fluidi corporei, previene le infezioni che potrebbero derivare da un contatto diretto con l'ambiente esterno e favorisce il processo di guarigione. Il sostituto cutaneo ideale deve essere facile da realizzare, durevole, poco costoso e, dal punto di vista biologico, deve riprodurre nella maniera più efficace possibile la fisiologia della cute senza indurre una risposta immunologica [Tabella 4.1].

Tabella 4. 1: Caratteristiche desiderabili per un sostituto cutaneo.

-
- Bilayered structure with both dermal and epidermal layers allowing rapid vascularization and re-innervation of the dermal part of the graft
 - Dermal layer construct leading to a more rapid and physiological repair of the wound
 - Fully functional epidermal layer that rapidly regains its barrier and protective feature
 - Full integration into the wound bed
-

4.1 EQUIVALENTI DELL'EPIDERMIDE

Per la produzione di sostituti dell'epidermide si esegue una biopsia dal paziente per prelevare 2-5 cm² di pelle autologa. Successivamente l'epidermide viene separata dal derma e i singoli cheratinociti vengono rilasciati per mezzo di enzimi e coltivati su fibroblasti di topo inattivati. Il mezzo di espansione usato contiene siero fetale di vitello e altri supplementi. I cheratinociti impiegano in media due-tre settimane per la loro espansione e generano i cosiddetti lembi di epidermide. Un esempio è dato da Epicel, uno dei primi prodotti commerciali [Tabella 4.1.1], in cui le cellule autologhe, prelevate tramite biopsia, vengono isolate e fatte crescere con cheratinociti murini per favorirne la proliferazione [14]. E' indicato per il trattamento di lesioni di medio ed elevato spessore che ricoprono almeno il 30% dell'area totale effettiva. L'intera TBSA può essere ricreata in quattro settimane, sebbene il tempo di preparazione minimo per ricoprire piccole aree sia di circa 16 giorni. Il vantaggio maggiore che rende il prodotto valido nel caso di ampie regioni danneggiate è legato alla ridotta quantità di materiale, 2-6 cm², che è necessario asportare. Tuttavia il costo è abbastanza elevato, la procedura richiede tempi di preparazione lunghi e il costrutto finale risulta fragile dal punto di vista meccanico, aspetto che grava a lungo termine sulle condizioni del paziente. L'applicazione di garze consente di riparare la superficie nel tempo minore possibile, ma si tratta di un costrutto instabile su cui si vengono spesso a formare cicatrici ipertrofiche. Il limite è insito nella non completa aderenza dell'epidermide, coltivata in laboratorio, al derma sottostante nel caso in cui questo sia poco vascolarizzato o vi sia in corso un'infezione. Per questa ragione spesso si utilizza un substrato dermico privato della componente epidermica come supporto su cui vengono poste poi le lamine di cheratinociti che danno luogo alla componente epiteliale. Si possono utilizzare materiali naturali, come nel prodotto Laserskin™, equivalente dell'epidermide composto di cheratinociti autologhi coltivati in laboratorio e seminati su una membrana di estere di acido ialuronico microforata al laser, oppure materiali sintetici, quale il caso di Hydroderm™ che sfrutta una membrana di poliuretano.

In alternativa all'utilizzo di cellule autologhe si possono creare, con la medesima procedura, alloinnesti caratterizzati da un costo più ridotto compensato, tuttavia, da un possibile rischio di contaminazione. La membrana amniotica umana funge,

analogamente all'epidermide, da barriera grazie alla presenza di collagene e fibronectina [15]. Questa tipologia di allotrapianto è stata rimpiazzata, nel 1960, dall'avvento degli xenotrapianti porcini, sebbene occasionalmente venga utilizzata anche oggi. Il costrutto si presenta trasparente e deve essere sostituito circa ogni due giorni, processo favorito dalla scarsa adesione di questo al tessuto sottostante. Il continuo rimpiazzo, tuttavia, permette a batteri e microorganismi di raggiungere il letto della ferita aumentando di conseguenza il rischio di contrarre infezioni rispetto all'impiego di altri sostituti. Il prodotto Epifix® è un esempio di membrana amniotica disidratata disponibile in commercio.

Tabella 4.1. 1: Prodotti commerciali disponibili per la sostituzione dell'epidermide.

Brand name/manufacturer	Graft type			Cell source	Biomaterial	Life-span
	Cell-free	Cell-based	Cell-seeded scaffold (TE)			
CellSpray Clinical Cell Culture (C3), Perth, Australia		x		Autologous keratinocytes	-	Permanent
Epichel Genzyme Biosurgery, Cambridge, MA, USA		x, cell sheet		Autologous keratinocytes	-	Permanent
EpiDex Modex Therapeutiques, Lausanne, Switzerland		x, cell sheet		Autologous keratinocytes	-	Permanent
EPIBASE Laboratoires Genevrier, Sophia-Antipolis, Nice, France		x, cell sheet		Autologous keratinocytes	-	Permanent
MySkin CellTran Ltd, Sheffield, UK			x	Autologous keratinocytes	Synthetic, silicone support layer with a specially formulated surface coating	Permanent
Laserskin or Vivoderm Fidia Advanced Biopolymers, Padua, Italy			x	Autologous keratinocytes	Recombinant, (HAM)	Permanent
Bioseed-S BioTissue Technologies GmbH, Freiburg, Germany			x	Autologous keratinocytes	Allogeneic, fibrin sealant	Permanent

HAM: hyaluronic acid membrane (microperforated).

4.2 EQUIVALENTI DEL DERMA

Per il trattamento di ustioni profonde devono essere sostituiti sia l'epidermide che il derma. La perdita di estese regioni del derma rappresenta un rilevante problema medico in quanto si è visto che esso non si rigenera autonomamente in vivo e potenzia la formazione di cicatrici. Dal punto di vista clinico le cicatrici pongono seri problemi: sono inaccettabili sia esteticamente che funzionalmente in quanto causa di continue contrazioni, che producono un'interfaccia instabile, e della formazione di carcinomi, come l'ulcera di Marjolin. Inoltre è lo stesso derma a garantire nutrimento all'epidermide le cui cellule, altrimenti, morirebbero. Rispetto agli strati epidermici i costrutti dermici ingegnerizzati provvedono a conferire una buona stabilità meccanica al tessuto. Il derma presenta un rilevante vantaggio che lo rende un buon candidato per realizzare un tessuto ingegnerizzato con scopo terapeutico. I fibroblasti, infatti, costituenti principali del derma,

crescono bene in coltura e hanno un'elevata capacità proliferativa. Inoltre, a differenza dei cheratinociti che trasportano sulla superficie gli antigeni dei leucociti, responsabili dei fenomeni di rigetto dell'innesto, l'impianto di fibroblasti allogeneici non stimola alcuna risposta immunitaria [16].

Lo scaffold può essere costituito da biomateriali naturali, come nel caso del collagene, o sintetici e può anche essere privo di cellule, sebbene questi siano poveri dal punto di vista funzionale.

Materiali biologici naturali, come la pelle umana o porcina, possono essere impiegati come sostituti perché provvedono a mantenere strutturalmente intatta la matrice extracellulare di elastina e collagene. Tuttavia resti di cellule del donatore portano a rigetto dopo circa 10-15 giorni dall'applicazione. Pertanto questi costrutti vengono usati come rivestimenti temporanei piuttosto che come sostituti permanenti. D'altra parte l'uso di tessuti umani o di animale ha come requisito la sterilizzazione per prevenire la trasmissione di malattie.

Metodi di sterilizzazione aggressivi quali il trattamento con ossido di etilene o radiazioni gamma inducono modifiche strutturali non sempre accettabili nel derma; minor effetto sulla struttura ha invece il trattamento con glicerolo. Esempio di alloinnesto che manca di elementi cellulari responsabili della reazione immunologica è Alloderm™, approvato da FDA nel 1992. Esso si ottiene trattando chimicamente la pelle fresca prelevata da cadavere con lo scopo di privarla dell'epidermide e distruggere le cellule ancora in vita nel restante derma, preservandone la matrice. Il processo di liofilizzazione, in seguito, trasforma questa matrice dermica, priva di cellule, in un innesto, comprensivo di membrana basale, inerte dal punto di vista immunologico. Al momento dell'impianto il prodotto provvede alla formazione di nuovo tessuto permettendo al sangue di fluire nei vasi sanguigni la cui struttura viene mantenuta. Questa fonte si conserva per circa due anni, risulta facile da immagazzinare in quanto non necessita di congelamento, ed è rapidamente disponibile per il trattamento dei pazienti ustionati. Tuttavia è necessario un secondo intervento chirurgico per inserire, a seguito della vascolarizzazione del derma, la componente epidermica mancante [17]. Nei sostituti dermici prodotti da molecole biologiche purificate mediante liofilizzazione viene spesso utilizzato il collagene come principale componente. Recenti studi sul collagene ricostruito, come impianti eterologhi o rivestimenti

temporanei per estese superfici danneggiate, hanno rinforzato il potenziale valore di questo biomateriale come base per gli innesti. In particolare Grillo e Gross nel 1962 mostrarono che la velocità di degradazione di tali impianti poteva essere ridotta creando dei legami incrociati del collagene con la formaldeide e che la risposta immunitaria nei confronti del collagene eterologo era abbastanza bassa da permetterne l'utilizzo. Questo biomateriale permette inoltre a fibroblasti, macrofagi e linfociti, provenienti dal letto della ferita, di insediarsi all'interno della matrice. Per controllare aspetti quali la dimensione dei pori e le connessioni si possono utilizzare diverse tecniche di liofilizzazione durante la fase produttiva. Inoltre si possono apportare modifiche aggiungendo cross-links e glicosamminoglicani (GAGs). L'uso di componenti biologici purificati permette di selezionare materiali con un basso o assente potenziale antigenico, sebbene vi sia scarsa informazione su cosa si possa o non si possa incorporare in tali costrutti per aumentarne l'efficacia.

Una matrice acellulare per la sostituzione del derma è OASIS[®], preparata a partire dalla mucosa intestinale porcina che viene opportunamente trattata per rimuovere le componenti cellulari, lasciando tuttavia intatta la struttura dell'ECM e altri componenti quali GAGs, fibronectina, proteoglicani e fattori di crescita. Come xenotrapianto viene comunemente utilizzato per ferite croniche e ulcere.

Integra[®], ad esempio, è un sostituto dermico biodegradabile che, dopo un certo intervallo temporale, risulta pienamente integrato nell'ambiente biologico e viene sostituito dal nuovo tessuto. Questo costrutto fu approvato dagli organismi competenti nel 1996. Il derma consiste in una matrice porosa di fibre di collagene bovino, tenute insieme da cross-links, contenente glicosamminoglicani, quali condroitin-6-solfato, derivanti dalla cartilagine di squalo. Il temporaneo sostituto dell'epidermide è un polimero di silicone che controlla la perdita di umidità della ferita [18]. La matrice è progettata in modo tale che i pori abbiano dimensioni di 20-60 μm adatte a promuovere l'adesione e la crescita dei fibroblasti e delle cellule endoteliali. Mentre la guarigione procede, i fibroblasti depositano una matrice di collagene endogeno e, in contemporanea, il derma artificiale viene degradato per lasciare il posto definitivo al neo-derma dopo circa 3-6 settimane dall'impianto. In seguito alla vascolarizzazione del derma lo strato temporaneo in silicone viene rimosso e sopra al neo-tessuto formato viene depositato lo strato di epidermide. Le

cellule dell'innesto autologo crescono e formano lo strato corneo chiudendo la ferita e ricostruendo un tessuto funzionale. Ad un primo intervento, dunque, segue un successivo, atto a rimuovere le lamine di silicone e innestare lo strato epidermico. Alternativamente, in caso di piccole ferite, si assiste alla formazione dell'epidermide senza il bisogno di un ulteriore trapianto.

Un diverso approccio nel quale si sfrutta l'attività esercitata dalle cellule è rappresentato da un prodotto denominato Dermagraft™ [19]. Questo costruito per la sostituzione del derma comprende uno scaffold riassorbibile di poliglactina sul quale vengono seminati fibroblasti allogenici di neonato. Le cellule stesse colonizzano il letto della ferita e secernono le proteine della matrice extracellulare, i fattori di crescita e le citochine che favoriscono la migrazione dei cheratinociti, finché non subiscono l'apoptosi fisiologica a poche settimane dall'impianto. Il prodotto non provoca rigetto, viene distribuito a -70°C su ghiaccio asciutto e scongelato dal chirurgo in sede di utilizzo. E' indicato principalmente come sostituto temporaneo per stimolare la guarigione di bruciature e lesioni croniche, quali l'ulcera diabetica al piede. Come la maggior parte dei sostituti cutanei, Dermagraft™ è controindicato per ferite localizzate o infette e per le persone allergiche al siero bovino contenuto nella confezione. Il prodotto clinicamente disponibile per il trattamento di bruciature è un equivalente del derma fatto di PGA (acido poli-glicolico) arricchito di fibroblasti e mantenuto congelato fino al suo impianto. Si tenga presente che i fibroblasti muoiono durante i processi di congelamento e scongelamento. Dal momento in cui sono in grado di secernere la matrice extracellulare e molte sue componenti, essi fungono essenzialmente da serbatoio di fattori di crescita e citochine che poi vanno ad interagire con il letto della ferita.

I sostituti del derma possono anche essere costruiti a partire da molecole non biologiche. I fibroblasti, e le cellule in generale, necessitano di un sito di legame e di opportuni segnali chemiotattici che ne indirizzino migrazione e proliferazione. Le interazioni di un tessuto sintetico sono totalmente diverse rispetto a quanto accade nella realtà biologica per cui si rende necessaria la funzionalizzazione biochimica. La degradazione dello scaffold, inoltre, gioca un ruolo fondamentale in due processi, la migrazione cellulare e la risposta da corpo estraneo. Una ridotta velocità di degradazione della matrice è associata ad un aumento della risposta

avversa dell'organismo nei confronti del derma impiantato. La persistente presenza di altri materiali o l'incapacità di metabolizzarla induce il sistema immunitario a rispondere. Durante il meccanismo di risposta da corpo estraneo si assiste alla formazione di cellule giganti seguita dall'incapsulamento dell'oggetto estraneo che porta poi all'infiammazione cronica. L'assorbimento di proteine e l'adesione dei macrofagi conduce infatti alla fusione degli stessi in FBGC (Foreign Body Giant Cells). Se l'infiammazione cronica non si risolve, si forma una capsula fibrotica attorno al corpo estraneo. Il rilascio di agenti degradanti bioattivi e aggressivi da parte dei macrofagi e delle FBGC coinvolti nella risposta influisce negativamente sul processo di guarigione in corso.

TransCyte® è un sostituto temporaneo del tessuto cutaneo adatto alla cura di varie ferite in quanto ne promuove la guarigione, in particolar modo di ustioni di secondo e terzo grado. Vengono seminati fibroblasti allogenic neonatali in uno strato di nylon ricoperto da collagene bovino che funge da substrato di supporto. Una lamina di silicone provvede invece a formare uno strato epidermico temporaneo che previene la perdita di acqua ed elettroliti e la trasmissione di infezioni. Le cellule sintetizzano fibronectina, collagene di tipo I, proteoglicani e fattori di crescita per circa 17 giorni. Il costrutto rimane aderente al letto della ferita finché non si ha sufficiente cute autologa disponibile, nel caso di ustioni di terzo grado, o finché non è terminato il processo di guarigione dell'ustione di secondo grado [20]. Il costrutto è crioconservato così da poter essere immagazzinato per lunghi periodi di tempo e disponibile repentinamente. Si rende necessaria una seconda fase di chirurgia per togliere il silicone e trapiantare epidermide autologa.

Un costrutto sintetico acellulare per la sostituzione del derma è Suprathel™, una membrana elastica sottile che si adatta alla superficie della ferita e vi aderisce il più delle volte senza necessitare di suture. Si tratta di un copolimero di polilattide, trimetil-carbonato e caprolattone. Il prodotto viene applicato una sola volta alla ferita che deve essere prima pulita e disinfettata. La membrana, dopo l'adesione, diviene trasparente permettendo così il controllo visivo del processo e risulta semipermeabile in modo da consentire il passaggio di ossigeno e vapore acqueo e allo stesso tempo impedire quello dei batteri. Inoltre l'acidificazione della ferita da parte del prodotto ha un ulteriore effetto antibatterico e minimizza così il rischio di

infezioni. La degradazione inizia dopo alcuni giorni dall'innesto ed è accompagnata da una graduale diminuzione della permeabilità della membrana per raggiungere il range fisiologico della pelle sana. Il processo stimola la guarigione, la rigenerazione del derma e supporta l'angiogenesi. Grazie alle sue proprietà elastiche si adatta bene a sostituire ogni parte del corpo, soprattutto mani, piedi e viso ed è indicato come rivestimento temporaneo per il trattamento di ustioni, abrasioni su larga scala e per la correzione delle cicatrici. Inoltre riduce la sensazione di dolore, non provoca fenomeni allergici e i costi di trattamento sono bassi in quanto non si necessita di un secondo intervento e di una lunga degenza. Se mantenuto in un luogo asciutto e fresco dura circa tre anni.

Tabella 4.2. 1: Prodotti commerciali disponibili per la sostituzione del derma.

Brand name/manufacturer	Graft type			Cell source	Biomaterial	Life-span
	Cell-free	Cell-based	Cell-seeded scaffold (TE)			
AlloDerm LifeCell Corporation, Branchburg, NJ, USA	x			-	Allogeneic human acellular lyophilized dermis	Permanent
Karoderm KaroCell Tissue Engineering AB, Karolinska University Hospital, Stockholm, Sweden	x			-	Allogeneic human acellular dermis	Permanent
SureDerm HANS BIOMED Corporation, Seoul, Korea	x			-	Allogeneic human acellular lyophilized dermis	Permanent
GraftJacket Wright Medical Technology, Inc., Arlington, TN, USA	x			-	Allogeneic human acellular pre-meshed dermis	Permanent
Matriderm Dr Suwelack Skin and HealthCare AG, Billerbeck, Germany	x			-	Xenogeneic bovine non-cross-linked lyophilized dermis, coated with α -elastin hydrolysate	Permanent
Permacol Surgical Implant Tissue Science Laboratories plc, Aldershot, UK	x			-	Xenogeneic porcine acellular diisocyanate cross-linked dermis	Permanent
OASIS Wound Matrix Cook Biotech Inc, West Lafayette, IN, USA	x			-	Xenogeneic porcine acellular lyophilized small intestine submucosa	Permanent
EZ Derm Brennen Medical, Inc., MN, USA	x			-	Xenogeneic porcine aldehyde cross-linked reconstituted dermal collagen	Temporary
Integra Dermal Regeneration Template Integra NeuroSciences, Plainsboro, NJ, USA	x			-	Xenogeneic and synthetic: polysiloxane, bovine cross-linked reconstituted	Semi-permanent
Terudermis Olympus Terumo Biomaterial Corp., Tokyo, Japan	x			-	Xenogeneic and synthetic: silicone, bovine lyophilized cross-linked collagen sponge made of heat-denatured collagen	Semi-permanent
Pelnac Standard/Pelnac Fortified Gunze Ltd, Medical Materials Center, Kyoto, Japan	x			-	Xenogeneic and synthetic: silicone/silicone fortified with silicone gauze TREX, atelocollagen derived from pig tendon	Semi-permanent
Biobrane/Biobrane-L UDL Laboratories, Inc., Rockford, IL, USA	x			-	Xenogeneic and synthetic: silicone film, nylon fabric, porcine collagen	Temporary
Hyalomatrix PA Fidia Advanced Biopolymers, Abano Terme, Italy	x			-	Allogeneic and synthetic: HYAFF layered on silicone membrane	Semi-permanent
TransCyte (DermagraftTC) Advanced BioHealing, Inc., New York, NY and La Jolla, CA, USA			x	Neonatal allogeneic fibroblasts	Xenogeneic and synthetic: silicone film, nylon mesh, porcine dermal collagen	Temporary
Dermagraft Advanced BioHealing, Inc., New York, NY and La Jolla, CA, USA			x	Neonatal allogeneic fibroblasts	Allogeneic and synthetic: PGA/PLA, ECM	Temporary
Hyalograft 3D Fidia Advanced Biopolymers, Abano Terme, Italy			x	Autologous fibroblasts	Allogeneic: HAM	Permanent

Fibroblasti e cheratinociti sono in grado di secernere le metalloproteinasi di matrice (MMP), una famiglia di enzimi proteolitici, caratterizzati da domini che legano lo zinco, che degrada varie componenti della ECM tra cui il collagene, nei confronti del quale è attiva la collagenasi. Sono coinvolte in un rilevante numero di processi di rimodellamento tessutale sia fisiologici, associati alla crescita e allo sviluppo, sia patologici. Le metalloproteinasi svolgono un importante ruolo nell'inibire i processi di guarigione dei tessuti lesionati soprattutto in ambiente umido, dove si necessita degli inibitori di questi enzimi per proteggere i fattori di crescita e permettere la guarigione. Inoltre i materiali impiantati, essendo corpi estranei, subiscono anche l'aggressione da parte dei macrofagi. Legami chimici, quali i cross-links, vengono sfruttati per rinforzare la stabilità e la resistenza del costruito alla collagenasi, ma possono avere effetto dannoso sul processo di guarigione. Questi legami, infatti, diminuiscono il tempo di sopravvivenza e la proliferazione dei fibroblasti e inducono una reazione da corpo estraneo. Aumentano inoltre la rigidità della matrice favorendo così la differenziazione dei miofibroblasti. Sebbene giochi un importante ruolo nel processo di guarigione, un'eccessiva presenza di questa linea cellulare aumenta la contrazione e la deposizione di collagene dando luogo a cicatrici ipertrofiche. In alternativa la degradazione del collagene può essere ridotta aggiungendo dei componenti all'ECM, GAGs come condroitin-6-solfato o eparina, che proteggano lo stesso dalla degradazione ad opera delle MMP. L'aggiunta di glicosaminoglicani, in aggiunta, permette un certo controllo sulle proprietà meccaniche e la dimensione dei pori del supporto. Il rivestimento delle fibre di collagene con fibronectina, acido ialuronico o elastina si è visto avere funzione stabilizzante nel sostituto dermico in un modello porcino. A differenza dell'elastina, acido ialuronico e fibronectina non migliorano il processo di guarigione, anzi esercitano effetti avversi sullo sviluppo del tessuto di granulazione e sulla rigenerazione epiteliale.

4.3 EQUIVALENTI DERMO-EPIDERMICI

Costrutti più sofisticati e avanzati sono quelli che ricalcano sia lo strato epidermico che il derma fornendo una corretta replica, anatomica e fisiologica, del tessuto perso [Tabella 4.3.1]. Molto spesso questi costrutti in vivo falliscono e quello che si fa è, come si è visto, creare derma ingegnerizzato con o senza uno strato sintetico

di epidermide temporaneo che verrà sostituito in un secondo momento, a seguito della vascolarizzazione dello strato sottostante, da epidermide autologa. Seguendo i principi dell'ingegneria tissutale è possibile ottenere un sostituto cutaneo composito originato dalla co-cultura di differenti popolazioni cellulari autologhe o eterologhe; in particolar modo nel progetto di cute ingegnerizzata i cheratinociti e i fibroblasti vengono incorporati in uno scaffold di sostegno [21]. Si tratta di rivestimenti, biologicamente attivi per la cura delle ferite, che agiscono in un intervallo di tempo limitato durante il quale producono la matrice e i fattori di crescita, iniziano e regolano il processo di guarigione della ferita e danno luogo ad un'efficace sollievo dal dolore. I maggiori problemi riguardano gli elevati costi di fabbricazione e la chiusura non permanente della ferita a causa del rigetto da parte del tessuto biologico. Per ottenere un effetto permanente, dunque, si devono sfruttare solo linee cellulari autologhe. I prodotti creati dall'espansione in vitro di fibroblasti e cheratinociti autologhi sono denominati CSS (Cultured Skin Substitutes). Essi generano un sostituto dermo-epidermico permanente e non antigenico che risulta facile da realizzare, caratteristiche compensate da alti costi di fabbricazione e tempi abbastanza lunghi di attesa. Recentemente se ne sono sviluppati diversi tipi con differenti scaffold biosintetici, tra cui uno dei più utilizzati è un sostituto derivato dall'acido ialuronico. Il biomateriale a base di acido ialuronico, infatti, è risultato un valido substrato per supportare la crescita e la differenziazione di cheratinociti, fibroblasti e cellule endoteliali. Presenta inoltre buone caratteristiche meccaniche e biologiche, controlla l'idratazione della matrice, l'osmosi e il processo infiammatorio. Da queste conoscenze è nato HYAFF 11[®], un derivato dell'acido ialuronico esterificato con alcol benzilico su cui vengono seminati i fibroblasti. Lo scaffold è realizzato con materiale naturale, non immunogenico, biocompatibile e bioattivo. Allo stesso tempo poiché acido ialuronico ed estere benzilico sono gli unici prodotti della degradazione non vengono rilasciate in ambiente biologico molecole tossiche. Inoltre le lunghe catene multimeriche di acido ialuronico vengono sciolte dalle ialuronidasi in corti oligomeri che portano ad un provato effetto angiogenico. Conseguentemente la degradazione dello scaffold di acido ialuronico promuove la rivascolarizzazione del letto della ferita, uno step essenziale ai fini della crescita cheratinocitaria. Lo scaffold si degrada lentamente: da una parte rimane intatto finché il neo-derma ne richiede

la presenza, mentre dall'altra parte i fibroblasti depositano la nuova ECM necessaria per la crescita del derma e per l'adesione dei cheratinociti. Il numero di cellule seminate è relativamente basso. Questo ha un duplice vantaggio: da un lato è richiesta solo una piccola biopsia (1-2 cm²) come risorsa delle cellule autologhe così da ridurre il disagio per il paziente, dall'altro le cellule necessitano di sole 2-3 settimane per proliferare, rendendo poi il costrutto pronto all'uso.

Tissue Tech Autograft System™ (TTAS) è un prodotto, approvato nel 1996, che rende possibile la chiusura permanente della lesione. Si utilizzano cheratinociti e fibroblasti autologhi coltivati su una membrana di acido ialuronico microforata [22]. Si impiega Hyalograft®3D, costituito da fibroblasti autologhi su microfibre di acido ialuronico, come sostituto dermico, e Laserskin™ per l'epidermide. Poiché vengono combinati due biomateriali indipendenti che devono essere applicati sulla zona lesa in successione, non si può parlare di un vero e proprio sostituto dermo-epidermico.

Un promettente costrutto in fase di sperimentazione è invece PermaDerm®, basato su una matrice di collagene su cui si dispongono poi i fibroblasti e i cheratinociti autologhi coltivati. E' sufficiente una porzione molto piccola di tessuto autologo per dare vita ad un tessuto ingegnerizzato di dimensioni cento volte tanto, attendendo circa trenta giorni. Questo prodotto è stato testato su oltre 150 pazienti pediatrici ustionati in condizioni critiche e i risultati ottenuti sono abbastanza incoraggianti. Trattandosi univocamente di cellule autologhe PermaDerm® non porta a rigetto dell'impianto da parte del sistema immunitario e per questo è stato pensato come sostituto permanente della cute. I costi sanitari sono ridotti grazie alla diminuzione dei giorni di ricovero in ospedale e non essendo necessario un successivo intervento. Viene applicato nel caso di ferite croniche o malattie della cute ed evita, come visto, la rimozione di grandi quantitativi di tessuto dal paziente stesso, riducendo così il rischio di infezione e l'ulteriore danno cutaneo.

OrCel™ è un composto doppio-strato caratterizzato da una matrice asimmetrica in cui una parte è rivestita da un sottile film di gel di collagene non poroso su cui vengono seminati i cheratinociti, e l'altra di collagene bovino impregnato di fibroblasti allogenici di neonato. Funge da matrice riassorbibile che rilascia citochine e fattori di crescita secreti dai fibroblasti. Il riassorbimento avviene in

maniera graduata e a due settimane dall'intervento non rimangono tracce delle cellule del donatore. Il tempo e la percentuale di cheratinociti e fibroblasti coltivati sono progettati in modo tale da avere il controllo sulla densità di cellule e citochine nel prodotto finale. Clinicamente è indicato per il trattamento di ulcere, bruciature profonde o parzialmente profonde e per la ricostruzione della mano in pazienti affetti da epidermolisi bollosa distrofica recessiva.

Un altro costrutto biosintetico per il ricoprimento temporaneo della ferita è Biobrane®, costituito da una membrana di nylon ricoperta da collagene bovino di tipo I, legata ad un sottile strato di silicone che funge da epidermide, impedendo la perdita di liquidi e la contaminazione. Piccoli pori rendono la membrana semipermeabile in modo da permettere l'uscita degli essudati e da consentire l'ingresso degli antibiotici. Durante i primi giorni i fluidi, provenienti dal letto della ferita, si dirigono verso il costrutto che diviene, con il procedere della guarigione, asciutto e caratterizzato da una spessa crosta che inizia a prudere. Non appena avviene la rigenerazione della cute il costrutto si separa dal letto della ferita facilitandone la rimozione. Solitamente l'adesione del costrutto dura circa due settimane trascorse le quali, se non si ha assistito alla guarigione, si esegue un secondo intervento. I vantaggi riguardano la salda aderenza del costrutto, la riduzione del dolore e della formazione di cicatrici. D'altra parte il sostituto richiede che il tessuto su cui aderisce sia ben vascolarizzato, pulito e disinfettato. Per la sua approvata validità in ambito clinico viene utilizzato principalmente, dal suo sviluppo nel 1979, per il trattamento di danni termici.

Tabella 4.3. 1: Sostituti commerciali dermo-epidermici disponibili in ambito clinico.

Brand name/manufacturer	Graft type			Cell source	Biomaterial	Life-span
	Cell-free	Cell-based	Cell-seeded scaffold (TE)			
Apligraf Organogenesis Inc., Canton, Massachusetts, CA, USA			x	Allogeneic keratinocytes and fibroblasts	Bovine collagen	Temporary
OrCel Ortec International, Inc., New York, NY, USA			x	Allogeneic keratinocytes and fibroblasts	Bovine collagen sponge	Temporary
PolyActive HC Implants BV, Leiden, The Netherlands			x	Autologous keratinocytes and fibroblasts	Synthetic, ... (PEO/PBT)	Temporary
TissueTech Autograft System (Laserskin and Hyalograft 3D) Fidia Advanced Biopolymers, Abano Terme, Italy			x	Autologous keratinocytes and fibroblasts	Recombinant, HAM	Temporary

PEO: polyethylene oxide terephthalate.

PBT: polybutylene terephthalate.

HAM: hyaluronic acid membrane (microperforated).

La semina di varie tipologie cellulari, come i fibroblasti per la ricostruzione del derma, all'interno di componenti extracellulari, soprattutto collagene, permette la creazione di strutture tridimensionali senza il bisogno di realizzare un supporto. Il concetto si mette in pratica in uno dei prodotti più completi, denominato commercialmente Apligraf™, approvato da FDA nel 1998 per il trattamento di ulcere croniche che non si curano autonomamente. Su un gel di collagene bovino di tipo I vengono seminati fibroblasti allogenici e, in seguito alla formazione del neo-derma, cheratinociti [23]. Lo strato di epidermide è infine esposto per 7-10 giorni all'interfaccia liquida o all'aria per permettere lo sviluppo dello strato corneo superficiale di barriera. A questo punto il costruito è pronto per l'impiego clinico e il risultato finale mostra una buona istologia connessa alla presenza di numerose tipologie cellulari che ben riproducono la fisiologia originale della cute [Fig.4.3.1].

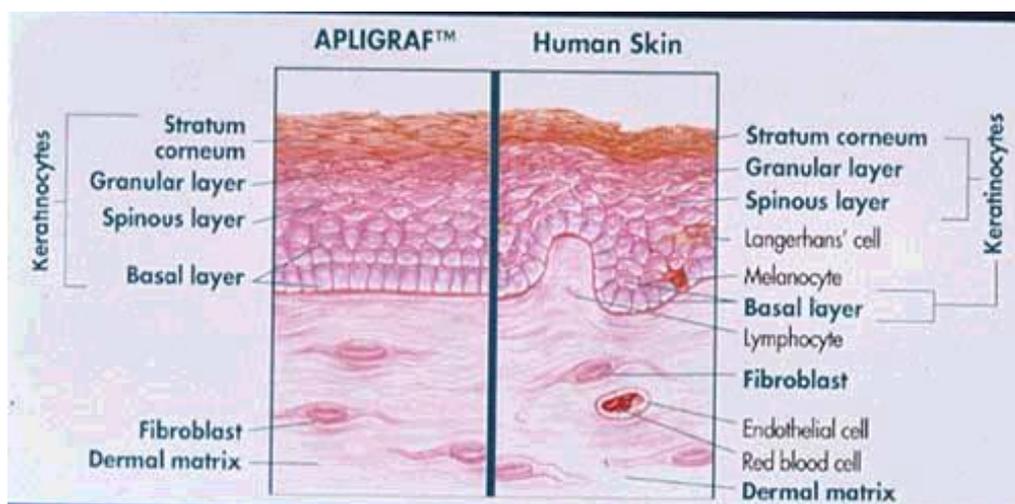


Fig. 4.3. 1: Confronto visivo tra cute umana e Apligraf™.

Inoltre non contiene alcuna cellula antigenica, quali cellule di Langerhans, cellule endoteliali, melanociti e leucociti, che possa portare a rigetto. Fibroblasti e cheratinociti che costituiscono il costruito, tuttavia, non hanno vita infinita e per questo lo si deve applicare ogni 4-6 settimane; il numero di applicazioni varia in base al tipo di ferita e alla sua localizzazione. La tipologia di sostituto e le modalità di impiego, infatti, vanno scelte in relazione alla criticità del paziente e al suo specifico quadro clinico. Un'attenta valutazione preliminare, dunque, risulta fondamentale per questo tipo di approccio.

4.4 CONSIDERAZIONI GENERALI

I sostituti cutanei, come si è visto, sono una classe eterogenea di dispositivi terapeutici. La scelta del sostituto varia in base al quadro clinico specifico e richiede un'attenta valutazione preliminare. Dall'analisi condotta si evince la mancanza di un sostituto perfetto che possieda tutte le proprietà desiderate tra cui costo abbastanza contenuto, facile applicazione, buon livello di resistenza alle infezioni e tempo di sopravvivenza tale da garantirne la disponibilità immediata. Esso dovrebbe inoltre riprodurre la corretta fisiologia della cute, sia del derma che dell'epidermide, e risultare non antigenico perché questo potrebbe comprometterne il trapianto. Malgrado tutti gli sforzi la riparazione di ferite di grande spessore è un aspetto non ancora completamente risolto. In generale la riproduzione esatta dell'istologia cutanea non è ancora stata possibile per la mancanza degli annessi cutanei, tra cui ghiandole sudoripare e follicoli piliferi. Inoltre, a meno che non si utilizzino linee autologhe, che però richiedono tempi di fabbricazione troppo lunghi, gli innesti provocano una risposta immunitaria nell'organismo. Ulteriori fattori critici sono rappresentati dalla creazione di una fitta rete di collegamenti nervosi che permette la trasmissione degli stimoli e dalla vascolarizzazione del tessuto creato in laboratorio. Un disguido rilevante dei costrutti ingegnerizzati compare infatti nella trasposizione in vivo in quanto le cellule devono continuare a ricevere nutrimento per il loro metabolismo, ovvero deve avvenire la vascolarizzazione del neo-tessuto. Quello che si è tentato di fare, a tal fine, è incrementare l'angiogenesi negli innesti. Un comune approccio è pertanto quello di stimolare la formazione di una rete di capillari applicando fattori di crescita, quale il fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF). Tuttavia la sopravvivenza nel tessuto di VEGF è molto breve e il flusso di sangue veramente limitato [24]. Si pensi che sostituti contenenti collagene e glicosamminoglicani, come Integra®, richiedono fino a 3 settimane per essere completamente vascolarizzati. Spesso si tratta di un'attesa improponibile per i sostituti dermo-epidermici in quanto le cellule dell'epidermide richiedono continuo nutrimento che in condizioni normali ricevono dai capillari del derma sottostante tramite la giunzione basale. Se questo fenomeno non avviene entro la prima settimana si ha la necrosi dell'epidermide.

Un gruppo di ricerca della LOEX, in Canada, ha messo a punto un equivalente cutaneo endoteliale in cui la rete di capillari viene ricostruita in vitro per accelerare il processo di neo-vascularizzazione del sostituto [25]. Vengono seminati i fibroblasti e le cellule endoteliali su uno scaffold di collagene bovino e GAG. La semina di cheratinociti, che svolgono un ruolo fondamentale nel mantenere contenuto il diametro dei capillari, porta poi alla formazione di un sostituto completo. Un altro gruppo, Boyce e collaboratori, procedettero su questa strada: seminarono fibroblasti e cellule endoteliali vascolari sul derma generato in vitro e in seguito cosparsero il costrutto di cheratinociti per creare l'epidermide [26].

5. APPLICAZIONI CLINICHE E PRE-CLINICHE

Nel corso degli anni sono stati compiuti numerosi progressi nello sviluppo di sostituti cutanei ingegnerizzati che ne hanno permesso l'utilizzo sia come innesti per la riparazione del tessuto danneggiato, con scopo terapeutico, sia come modelli di sistemi per l'analisi di diversi processi e malattie a carico della cute.

5.1 APPLICAZIONI IN VITRO

I sostituti cutanei ingegnerizzati sono stati sviluppati con l'idea base di riprodurre gli aspetti chiave, strutturali e funzionali, della pelle naturale. Oltre al loro impiego in vivo nei trapianti cutanei, di recente si è pensato di utilizzarli come sistemi di test in vitro [27]. In quest'ottica consentono non solo l'analisi dei processi fondamentali che coinvolgono la cute, ma anche la valutazione degli effetti dannosi di vari composti chimici che vengono a contatto con la pelle, evitando il ricorso al modello animale. Ai risultati ottenuti da esperimenti condotti sui modelli animali, inoltre, si deve guardare con un occhio di riguardo a causa delle differenze evidenti nel metabolismo e nell'architettura anatomica [Fig. 5.1.1].

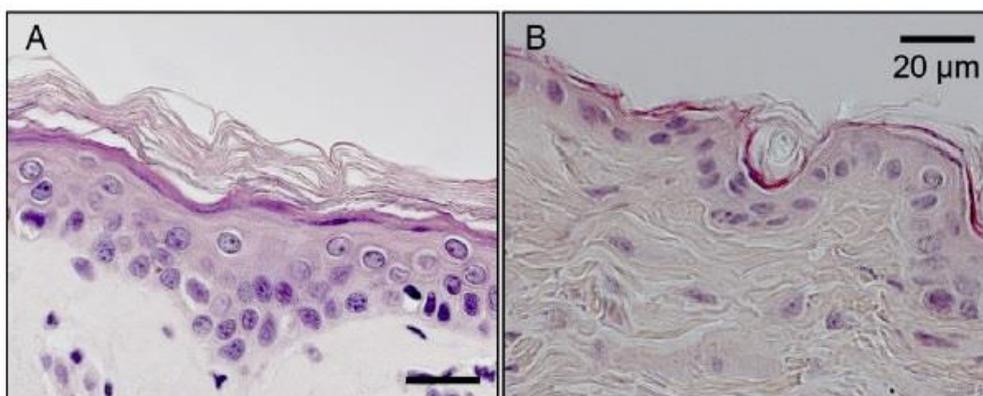


Fig. 5.1. 1: L'istologia rileva significative differenze morfologiche e anatomiche tra la pelle umana (A) e quella di topo (B).

Scarsamente informativi sono anche gli esperimenti in vitro condotti su colture mono-strato bidimensionali di cellule umane a causa della mancanza delle interazioni cellula-cellula e cellula-matrice fondamentali in tutti i processi fisiologici. I costrutti bioingegnerizzati superano questi problemi in quanto le

cellule umane vengono arrangiate in un supporto tridimensionale, garantendo così una maggior capacità di interazione.

Negli studi farmacologici essi servono da modello affidabile per identificare le proprietà irritative, tossiche e corrosive di agenti chimici che vengono a contatto con la cute. Nella ricerca di base, invece, vengono utilizzati per lo studio dei diversi processi fondamentali che coinvolgono la pelle, come la formazione dell'epidermide, il mantenimento delle cellule staminali, il processo di guarigione e le infezioni causate da diversi patogeni.

Uno dei maggiori vantaggi legati all'utilizzo dei costrutti ingegnerizzati è che la composizione cellulare è completamente controllabile dal ricercatore. In tal modo una data linea cellulare può essere inserita o tolta ai fini di valutarne l'influenza nel processo biologico preso in esame.

5.1.1 TEST BASATI SU MODELLI CUTANEI

La pelle umana è esposta quotidianamente ad un numero rilevante di agenti chimici che devono essere classificati sulla base della loro capacità di danneggiare la cute. Il processo è definito corrosivo se la cute è lesa in maniera irreversibile, irritativo se è invece alterata reversibilmente.

Per analizzare il potenziale danneggiamento Drazie et al. nel 1944 svilupparono un test basato sull'applicazione topica di sostanze campione sulla pelle di coniglio albino per periodi che vanno dalle 4 alle 48 ore [28]. A meno di alcune modifiche questo saggio viene utilizzato anche oggi. Tuttavia, a parte l'essere eticamente discutibile, il test tende a dare informazioni poco accurate. Le indicazioni attuali, inoltre, si muovono verso sistemi di test che evitano l'impiego di animali. Nell'Unione Europea il settimo emendamento della "Direttiva Cosmetici" stabilisce che tutti gli esperimenti concernenti il riassorbimento cutaneo condotti sugli animali devono essere sostituiti da test alternativi in vitro a decorrere dal 2009 [29]. In questo contesto fu introdotto il principio delle 3R "Replace, Reduce and Refine", che stabilisce che i test devono essere perfezionati minimizzando lo stress per gli animali (Refine), che il numero degli animali che vengono testati deve essere ridotto il più possibile (Reduce) e che si preferiscono, qualora esistano, i modelli di test in vitro (Replace).

I primi test furono sviluppati per distinguere tra sostanze corrosive e non. Un approccio fu quello di misurare la variazione della resistenza elettrica transcutanea (TER) di un pezzo di cute umana o di coniglio, causata dall'applicazione di agenti corrosivi.

Nell'approccio Corrositex™, invece, una membrana di proteine viene utilizzata per simulare la funzione barriera esercitata dalla pelle. Le sostanze corrosive sono in grado di distruggere tale membrana e dar luogo ad un cambiamento cromatico. Per determinare il potenziale corrosivo di una sostanza sfruttando i tessuti ingegnerizzati solitamente si usano saggi a base di MTT e colorazione con ematossilina-eosina. Questi sono ampiamente disponibili e somigliano istologicamente e funzionalmente alla pelle umana.

Diversamente dai saggi di corrosione acuta, i test di irritazione cutanea sono molto complessi e richiedono non solo una misura della citotossicità, ma anche delle reazioni metaboliche, come il rilascio di citochine ed enzimi [30]. La presenza dello strato corneo nell'epidermide ricostruita rende possibile l'applicazione topica di una grande varietà di prodotti utilizzati nella vita quotidiana per esaminare la loro efficacia, le trasformazioni metaboliche e i potenziali effetti indesiderati. Molti test di irritazione cutanea sono dunque stati sviluppati per analizzare i cambiamenti nell'integrità dello strato corneo, nella morfologia dell'epidermide e il rilascio di mediatori infiammatori. Per i test in vivo si preferiscono metodi non invasivi come la valutazione dei cambiamenti nella perdita di acqua trans-epidermica o nel flusso di sangue cutaneo.

Tuttavia gli equivalenti cutanei non possono sostituire in toto gli esperimenti sugli animali in quanto finora non si può analizzare, tramite il loro impiego, ad esempio, alcuna risposta sistemica all'applicazione di una sostanza.

Uno degli impieghi di maggior rilievo per l'estrapolazione di dati con scopo terapeutico è l'assorbimento cutaneo. Questo interesse sorge per due ragioni. In primo luogo la pelle umana o animale usata per questi studi scarseggia e manca di standardizzazione: la variabilità da donatore a donatore è abbastanza significativa da non permettere il confronto tra esperimenti condotti in tempi differenti. In secondo luogo vi è, come visto, un forte desiderio di sostituire il più possibile alcuni test sugli animali, condotti in dermatologia e cosmetologia, con costrutti cellulari in vitro. Tuttavia bisogna tenere in considerazione, nella discussione dei

risultati che si ottengono, che la permeabilità complessiva dei sostituti cutanei spesso risulta maggiore rispetto a quella pelle umana. Molti farmaci e cosmetici vengono applicati sulla pelle, ma la percentuale di sostanza che effettivamente raggiunge il sito rimane spesso incognita. E' di grande interesse, dunque, per l'industria cosmetica, avere dei modelli in vitro che possano determinare quanto, della formula cosmetica, penetri attraverso lo strato epidermico nella pelle. Inoltre risulta cruciale analizzare i siti in cui la sostanza ha maggiore effetto, sia localmente nella pelle, sia a livello sistemico attraverso i vasi sanguigni. Come si è osservato più volte, la cute ingegnerizzata, a differenza di quella nativa, manca di ghiandole e follicoli che rappresentano aperture che possono aumentare la permeabilità della pelle, fattore da tenere in considerazione nell'analisi finale dei risultati.

La cute è esposta a radiazioni potenzialmente pericolose che possono causare serie alterazioni ed è per questo ricca di melanina, preposta al loro assorbimento. L'investigazione delle reazioni della pelle alla luce solare richiede dunque l'aggiunta di melanociti per mimare la realtà biologica in vitro. L'esposizione della pelle al sole può portare a eritema e anche allo sviluppo del melanoma. Per proteggere la cute naturale in vivo dai danni delle radiazioni sono state dunque create diverse lozioni per uso topico e la loro commercializzazione avviene spesso a seguito del superamento di questi test.

Sebbene la grande maggioranza dei sostituti usati in ricerca farmacologica sia composta solo dallo strato epidermico, questi possono essere ulteriormente arricchiti dall'aggiunta dello strato dermico contenente fibroblasti. Si è scoperto che i fibroblasti della pelle sono lontani dall'essere omogenei e che alcune ferite croniche sono in grado di cambiarne la composizione. I fibroblasti hanno influenza positiva sui cheratinociti, di cui stimolano la crescita in vitro soprattutto grazie alla produzione di fattori di crescita solubili. Nella cute naturale le interazioni tra fibroblasti e cheratinociti giocano un ruolo fondamentale in processi quali la guarigione e la formazione della membrana basale. In assenza dei fibroblasti la differenziazione dei cheratinociti è molto compromessa e avviene solo nelle zone dove le cellule epiteliali sono altamente differenziate. D'altra parte anche i cheratinociti hanno un effetto positivo sui fibroblasti, caratterizzati da un ruolo attivo nel rimodellamento cutaneo, nella contrazione di ferite acute e

nell'aumentare la resistenza dei cheratinociti agli agenti chimici tossici. Da queste considerazioni si evince come il solo strato di epidermide funga da buon modello per i test sul coefficiente di penetrazione della sostanza, mentre sia insufficiente nel caso si compiano studi tossicologici, dove si rende necessario l'impiego di modelli doppio-strato. Bell et al. descrissero il primo processo per generare un sistema di test in vitro con entrambe le componenti, derma ed epidermide [31]. Fibroblasti allogenici vengono seminati su una matrice di collagene bovino di tipo I e i cheratinociti sono coltivati sulla superficie della matrice all'interfaccia liquida o aerea. Questo sostituto viene impiegato per il trattamento di ferite croniche con il nome di Apligraf™, mentre come sistema di test in vitro prende il nome di TESTSKIN™. Fino ad oggi sono state descritte diverse tecniche per la formazione di derma ex vivo, quali la semina di fibroblasti su gel di collagene idratato, su gel fibrinico o su supporti di collagene e GAGs. In un diverso approccio fibroblasti con elevata densità vengono seminati su una membrana sintetica; con il passare del tempo i fibroblasti generano da sé la matrice che può essere impregnata di cheratinociti per ottenere un costrutto completo.

L'aggiunta degli annessi cutanei quali follicoli piliferi, ghiandole sebacee e sudoripare migliora l'istologia e la funzionalità della pelle, nonché la qualità del processo di guarigione nei pazienti gravemente ustionati. Da più di vent'anni i follicoli piliferi vengono coltivati su matrici di collagene, tuttavia l'integrazione degli annessi cutanei all'innesto per il trattamento di ingenti ustioni rappresenta ancora uno dei principali problemi. In quest'ottica uno studio recente ha testato l'integrazione delle ghiandole sudoripare in un costrutto bioingegnerizzato [32]. Le cellule di tali ghiandole vengono coltivate su microsfele di gelatina contenenti fattori di crescita endoteliali.

La cute è attraversata dalla rete di capillari del derma che vengono distrutti nel caso di ferite profonde del tessuto. Un rilevante problema, come visto, dei sostituti completi è la necrosi dovuta a un'insufficiente neo-formazione dei canali sanguigni che non consente il nutrimento cellulare. I modelli di angiogenesi sono adatti allo studio dei fattori che promuovono o rallentano il fenomeno, delle metalloproteinasi di matrice, delle molecole di adesione cellulare e della fibrolisi. Frequentemente si tratta di gel tridimensionali, seminati di cellule endoteliali, contenenti varie componenti della ECM. Tuttavia questi modelli hanno alcune

limitazioni significative, come la presenza di una sola tipologia cellulare, cellule animali anziché umane e la necessaria addizione di agenti promotori quali il VEGF per ottenere la struttura dei capillari. I sostituti cutanei endotelizzati non presentano questi svantaggi, ma una ragione per cui non si creano in vitro dei capillari maturi è la mancanza della riproduzione dello stress a cui sono sottoposte le cellule nella realtà biologica.

5.1.2 MODELLI PER LE MALATTIE CUTANEE

Nella pelle le interazioni di cheratinociti, fibroblasti, melanociti e cellule del sistema immunitario sono finemente controllate da vari fattori. La distruzione di questo sistema può dar luogo ad una proliferazione incontrollata dei cheratinociti o dei melanociti, come accade nel melanoma. Inoltre è esposta all'influenza esterna di patogeni, microorganismi, virus e danni meccanici. Lo studio in vitro di questi eventi aiuta a comprendere il decorso della malattia, passo essenziale per lo sviluppo di nuove terapie che risultino efficaci e non rechino danno all'organismo. Il grande vantaggio di questi modelli artificiali è inoltre la possibilità di simulare lo stato di malattia della pelle in laboratorio.

5.1.2.1 MODELLI PER IL TRATTAMENTO DELLA PSORIASI E DELL'HERPES

La psoriasi è un'inflammatione della cute che risulta ricoperta di incrostazioni e arrossata. L'eccessiva proliferazione dei cheratinociti nelle zone affette è una comune caratteristica della malattia, come rivela il rapporto istologico in cui una spessa epidermide si estende in profondità dentro al derma [33]. La generazione in vitro di sostituti contenenti cellule isolate del paziente affetto dalla psoriasi ha aiutato ad approfondire le conoscenze in merito alla patologia.

L'infezione da HSV (Herpes Simplex Virus) è una malattia comune della pelle umana che da luogo a lesioni dolorose. A parte questi sintomi locali, è in grado di infettare le cellule dell'epidermide portando alla formazione di ammassi sinergici di cellule e di integrarsi nel genoma delle cellule dei gangli spinali rimanendo latente per lunghi periodi di tempo. I modelli in vitro sono stati utilizzati per analizzare lo stadio iniziale dell'infezione in cui il virus penetra l'epidermide.

5.1.2.2 MODELLI PER LA CURA DEL MELANOMA

Il melanoma maligno è una delle malattie più aggressive della cute. Prende avvio da processi multi-stadio i cui iniziatori sono i melanociti localizzati nella membrana basale [34]. Essi perdono il contatto con i cheratinociti che li circondano ed entrano in una fase di crescita radiale seguita da una fase di crescita verticale in cui le cellule possono penetrare la membrana stessa. Le suddette trasformazioni sono provocate, oltre che dall'alterazione genetica, anche da altri comandi per la formazione di cellule tumorali. L'ipotesi è stata supportata dall'osservazione di un'elevata capacità proliferativa dei melanociti senza che vi sia presenza di cheratinociti. La grande espansione è causata dalla metastasi, dovuta alla fase di crescita verticale attraverso la membrana che separa il derma dall'epidermide. I cosiddetti MSS (Melanoma Skin Substitutes) garantiscono un setup sperimentale controllato in cui vengono aggiunte cellule di melanoma per osservarne il comportamento, associato alle interazioni cellula-cellula e cellula-matrice, durante la crescita e la produzione di fattori di crescita ad opera di questa linea tumorale [Fig. 5.1.2.2.1]. Inoltre i sostituti cutanei possono essere sfruttati per lo sviluppo di farmaci contro il melanoma permettendo lo studio *in vitro* dell'effetto che questi hanno sulle cellule tumorali. Tuttavia per analizzare pienamente il processo di angiogenesi e metastasi sarebbe necessaria la presenza di sostituti vascolarizzati.

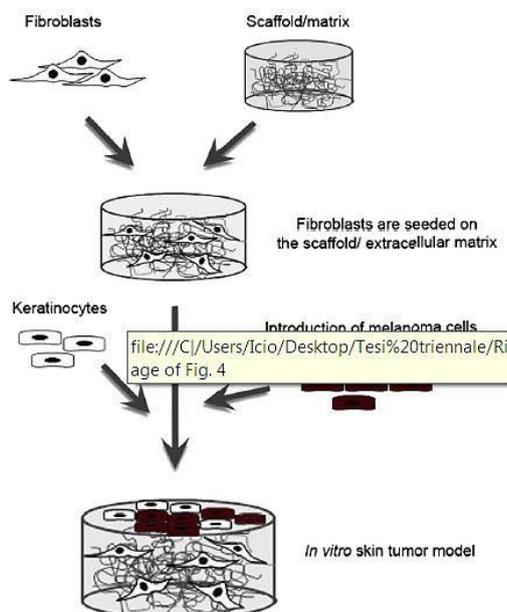


Fig. 5.1.2.2. 1: Modello schematizzato *in vitro* per lo studio del melanoma.

5.1.2.3 MODELLI PER WOUND HEALING

I sostituti cutanei hanno permesso l'analisi e l'individuazione della specifica sequenza dei fenomeni che hanno luogo durante il processo di guarigione. La riparazione di una ferita è infatti il risultato di una serie di eventi sovrapposti che possono essere suddivisi in quattro fasi: emostasi, infiammazione, formazione di tessuto granuloso e cicatriziale [Tabella 5.1.2.3.1].

Tabella 5.1.2.3. 1: Fasi del processo di riparazione della ferita.

Emostasi-Formazione del coagulo	Piastrine
Infiammazione	Granulociti neutrofilii, linfociti, macrofagi, piastrine e loro prodotti
Formazione del tessuto di granulazione	Fibroblasti, collagene e molecole della ECM
Neo-angiogenesi	Fattori di crescita e cellule endoteliali
Rimodellamento della ferita	Metalloproteasi, collagene e cheratinociti

Conseguentemente alla lesione, le piastrine aggregano e formano un tappo emostatico convertendo il fibrinogeno in fibrina. Oltre a prevenire la perdita dei fluidi corporei, le piastrine rilasciano fattori di crescita come il TGF- β e proteine adesive, tutte molecole che attivano le cellule nell'area limitrofa. Durante la fase infiammatoria, nel sito danneggiato compaiono i neutrofilii che rilasciano una grande varietà di sostanze antimicrobiche come peptidi cationici, proteasi e specie reattive all'ossigeno importanti per la pulizia del letto della ferita e per la prevenzione dalle infezioni. Un altro modo per ripulire la ferita è il rilascio di radicali liberi, che tuttavia possono danneggiare le cellule sane della cute. Trascorsi due giorni i macrofagi raggiungono il sito danneggiato e iniziano la degradazione degli elementi matriciali e del debris cellulare, rilasciando allo stesso tempo fattori di crescita e citochine. E' stato inoltre dimostrato che i macrofagi supportano l'angiogenesi del neo-tessuto. Una parte della formazione del tessuto granuloso è dovuta all'arrivo dei cheratinociti nel letto della ferita con cui inizia la produzione di endotelio. I fibroblasti, in aggiunta, secernono la nuova matrice extracellulare. Il tessuto che si forma consiste di glicosamminoglicani, proteoglicani, collagene di tipo III, fibronectina e vitronectina. Mentre ha luogo l'angiogenesi i fibroblasti si

trasformano in miofibroblasti che uniscono i margini della ferita riducendone le dimensioni. L'ultima fase è il passaggio da tessuto granuloso a cicatriziale, la cui caratteristica è la diminuzione dell'infiammazione e dei capillari. I miofibroblasti subiscono apoptosi e una nuova matrice di collagene sostituisce quella provvisoria. Questa cascata di eventi rappresenta il normale sviluppo del processo di guarigione in cui si ristabilisce l'equilibrio tra formazione di cicatrici e rimodellamento delle stesse. Viceversa nel caso di lesioni di ampio spessore la risposta patologica può dar luogo a fibrosi o ad ulcere croniche. La prima è caratterizzata da un'eccessiva deposizione di matrice che porta ad una perdita delle funzionalità del tessuto. La formazione di ulcere croniche sembra invece dipendere da differenze sul fenotipo dei fibroblasti adiacenti alla ferita. La popolazione alterata è caratterizzata da un basso potenziale proliferativo, da una morfologia appiattita e porta ad un aumento del collagene che rende la ferita cronica. Lo studio del processo di guarigione in vitro è molto importante e per questo si possono seguire principalmente tre approcci: un saggio di coltura di cellule mono-strato, un modello di cute in vitro, oppure culture di pelle ex vivo. Uno dei modelli più semplici è quello della coltura bidimensionale di cellule mono-strato. I fibroblasti vengono seminati in un piatto di coltura e fatti crescere; il costrutto viene poi danneggiato rimuovendone una parte con una lametta da barba [35]. Questo modello è utile per lo studio delle risposte migratorie e proliferative e per il rilascio di citochine; per investigare sulla sintesi proteica e sulla ri-epitelizzazione si necessita di modelli più sofisticati. I sostituti cutanei portano maggiori informazioni, ma la guarigione interessa diverse tipologie cellulari, non solo fibroblasti e cheratinociti, pertanto gli ultimi sforzi riguardano la coltura a lungo termine di pelle ex vivo o il miglioramento delle prestazioni dei sostituti inglobandovi altre linee cellulari. Vi sono diverse metodiche per indurre in laboratorio un danno cutaneo come ferite, abrasioni o ustioni. Gli strumenti comunemente utilizzati sono scalpelli, perforatori da biopsia, azoto liquido e laser. Una delle cause principali di lesione cutanea è il danno termico: nel modello per bruciature è abitudine sfruttare una corda di ottone a 150°C. Tuttavia per avere una maggior riproducibilità nelle dimensioni della ferita conviene utilizzare il laser.

5.2 APPLICAZIONI IN VIVO

Ci sono diverse ragioni alla base delle lesioni del tessuto cutaneo, alcune delle quali riguardano disordini genetici, traumi acuti, ferite croniche o interventi chirurgici. Nel momento stesso in cui la cute viene danneggiata, ha inizio una cascata di eventi: le cellule immunitarie vengono attratte dal sito danneggiato, i fibroblasti generano una nuova matrice e in seguito si assiste alla neo-formazione di epitelio da parte dei cheratinociti ed, eventualmente, alla neo-vascolarizzazione della ferita [36]. Questo complesso processo di guarigione è stimolato e controllato da diversi fattori di crescita e citochine. Nel caso in cui la superficie lesa sia troppo ampia potrebbe risultare molto lento cronicizzando la ferita e, nell'ipotesi peggiore, causando la morte del paziente [Fig. 5.2.1].

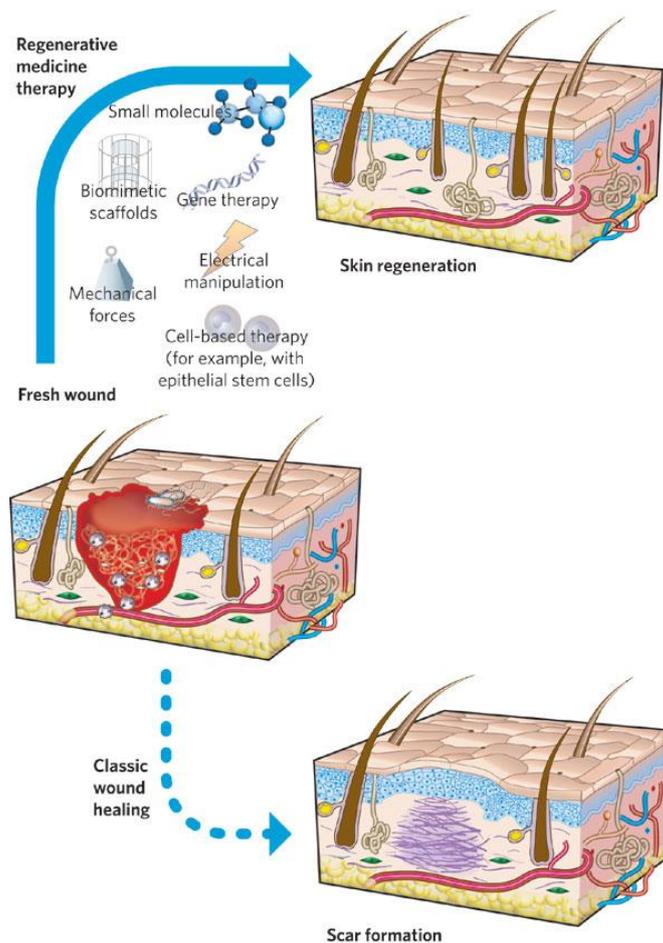


Fig. 5.2. 1: Si osservano le due possibili vie per la guarigione della ferita, autonomamente o attraverso la medicina rigenerativa.

I difetti cutanei possono essere suddivisi, sulla base della profondità del danno, in lesioni epidermiche, superficiali a spessore parziale, profonde a spessore parziale o a pieno spessore. Le ferite dei primi tre tipi illustrati sono in grado di dar luogo autonomamente alla rigenerazione cutanea iniziando la migrazione dei cheratinociti dal letto della ferita o dai follicoli e dalle ghiandole sudoripare nel derma restante. Le ferite a pieno spessore, invece, sono caratterizzate dalla completa distruzione degli elementi rigenerativi che risiedono nel derma e pertanto non stimolano la guarigione. La dimensione della ferita è un fattore critico per il neo-tessuto epiteliale che si deve formare tanto che le ferite profonde, dal diametro superiore a 1 cm, necessitano di un trapianto cutaneo per prevenire la formazione di cicatrici estese.

L'impeto iniziale per lo sviluppo di cute ingegnerizzata era sorto dalla necessità di sostituire autotrapianti, allotrapianti e xenotrapianti in caso di grandi ustioni caratterizzate dal bisogno critico di coprire il sito leso in pazienti con risorsa autologa insufficiente per il trapianto. In seguito hanno riscontrato ampio successo nel trattamento di ferite croniche, come ulcere venose e diabetiche. Il vecchio paradigma per la guarigione di ferite croniche era essenzialmente di tipo passivo e consisteva nel rimuovere ciò che impediva il processo, come infezioni e ischemie, per permettere alla natura di fare il proprio corso. Nell'approccio contemporaneo, che non ignora queste basi, si interviene e si migliora il naturale processo di guarigione usando varie modalità come l'ossigeno iperbarico, la stimolazione elettrica, la pressione negativa sulla superficie della cute, i fattori di crescita e i tessuti ingegnerizzati.

Le ulcere croniche degli arti inferiori sono una patologia che colpisce soprattutto i diabetici e gli anziani, e sono in continuo aumento; già oggi, solo in Italia, le persone che si trovano in questa condizione sono quasi un milione. Una soluzione a questo problema, sia in termini di percentuale delle guarigioni e quindi di qualità della vita, sia in termini di costi per il sistema socio-sanitario, è rappresentata dai tessuti bioingegnerizzati. La cute autologa bioingegnerizzata TissueTechAutograft System, prodotta a Padova da Fidia Advanced Biopolymers, provoca infatti la riattivazione dei processi di riparazione della ferita grazie alla presenza dell'acido ialuronico, che costituisce il materiale con cui è realizzato il supporto dei fibroblasti per il derma e dei cheratinociti per l'epidermide. Rispetto alle terapie

tradizionali, l'utilizzo della cute bioingegnerizzata oltre a offrire risultati migliori accorcia i tempi di guarigione e riduce l'invasività della terapia, diminuendo in tal modo i costi.

L'immediato ricoprimento di una ferita è un punto essenziale per il suo trattamento, impedisce la perdita dei fluidi corporei e blocca i batteri, causa di infezioni. La maggior parte dei sostituti della cute non sopravvivono a lungo in vivo, bensì hanno azione temporanea. Il loro principale effetto è quello di promuovere la guarigione della ferita, stimolando la produzione di citochine e di componenti della membrana basale che idratano la ferita, e aumentando la produzione del tessuto di granulazione. Un'ampia varietà di matrici acellulari vengono usate per promuovere la rigenerazione cutanea della ferita, come Alloderm®, OASIS®, Integra® Dermal Regeneration Template e Biobrane®.

In generale le esperienze condotte con i fattori di crescita allo scopo di accelerare il processo di guarigione delle ferite sono complesse e non sempre portano a risultati ottimali. Questo è dovuto alle molteplici interazioni fra citochine solubili, cellule ematiche circolanti, matrice extracellulare e cellule che hanno luogo durante il processo fisiologico di guarigione e che non si riesce a riprodurre in vitro. Spesso inoltre i fattori di crescita agiscono a gruppi, non da soli, e durante precise fasi del processo. Solo il fattore di crescita ricombinante, derivato dalle piastrine, è stato approvato dalla FDA per il trattamento delle ferite.

Sono di utilizzo comune nel wound healing anche membrane antibatteriche basate sull'aggiunta di nanoparticelle contenenti ioni d'argento. Gli ioni sono capaci di denaturare gli acidi nucleici e le proteine dei batteri legandosi alle cariche negative e liberando ossigeno che distrugge la parete cellulare dei batteri, fungendo così da antimicrobico. In commercio esistono diversi dispositivi che impiegano la deposizione in fase vapore per deporre l'argento su una matrice polimerica. Tuttavia l'argento metallico subisce ossidazione che rilascia una colorazione grigio-blu sulla cute. A causa di questo inconveniente questi dispositivi devono essere sostituiti con cadenza periodica. L'effetto non è stato notato impiegando nanoparticelle create tramite electrospinning che rappresentano dunque una valida alternativa.

5.2.1 TRATTAMENTO DEL MELANOMA

I nevi giganti congeniti sono larghe lesioni che possono ricoprire anche il 50% dell'intera superficie corporea. Essi sono considerati i precursori del cancro in quanto propensi a trasformarsi nel melanoma maligno [37]. Sull'associazione tra la presenza di questi nevi e l'insorgere del tumore non vi sono dubbi e alcuni studi hanno riscontrato un significativo aumento del rischio del melanoma in pazienti con nevi del diametro superiore a 20 cm o ricoprenti più del 5% dell'area effettiva. L'esatta ampiezza del rischio è tuttora sconosciuta. Il problema principale riguarda il fatto che i melanociti si trovano nel derma e nell'ipoderma, rendendo così necessaria l'asportazione di una grande quantità di materiale non solo in larghezza ma anche in profondità, per scongiurare completamente la possibile insorgenza del tumore. Costrutti tridimensionali ricostruiti sono, come si è più volte notato, dispositivi promettenti per il trattamento di ustioni, ulcere e anche di questi nevi giganti. Il maggior problema connesso all'utilizzo di un approccio convenzionale rimane la quantità di cute richiesta per la completa chiusura della ferita e la possibile presenza di nevi satellite o con potenziale capacità di trasformazione dei melanociti anche in seguito al trapianto.

I sostituti cutanei offrono una valida alternativa che presenta vantaggi quali l'eliminazione del dolore nel sito donatore, dello sviluppo di cicatrici, prurito e ferite croniche. Inoltre l'impiego di sostituti costruiti su substrati di collagene e GAGs porta ad un risultato simile all'autotrapianto e offre l'essenziale vantaggio di minimizzare la richiesta di cute iniziale. L'impiego di questi sostituti dà luogo ad una cute che manca del suo naturale pigmento; questo rappresenta un serio inconveniente nella sostituzione di vaste porzioni di superficie come nel caso sotto esame, pertanto si introducono melanociti nei costrutti ingegnerizzati in modo da migliorarne l'estetica. In questo modo si realizza un costrutto cutaneo che non vuole solo ridurre il rischio di propagazione delle alterazioni genetiche, ma vorrebbe anche fungere da strumento utile per il trattamento delle malattie cutanee che richiedono il trapianto di regioni molto estese.

6. CONCLUSIONI

L'ingegneria tissutale della cute ha preso avvio da una prima generazione di foglietti di epidermide autologa coltivata ed è giunta alla creazione di un sostituto cutaneo a doppio strato complesso. Nonostante gli innegabili vantaggi, infatti, fu subito chiaro che l'applicazione di una semplice coltura di cheratinociti sulla ferita non poteva sostituire in alcun modo la cute integra. In primo luogo, per ottenere un vero e proprio tessuto cutaneo, le cellule devono poter crescere su una matrice che funga da supporto e che consenta alle cellule stesse di disporsi nello spazio secondo l'architettura tipica della pelle. In secondo luogo, l'adesione dell'epidermide coltivata in laboratorio risulta ottimale solo quando i cheratinociti trovano un letto dermico perfettamente idoneo, che sia vascolarizzato e privo di infezioni.

Allo stato dell'arte nel mercato non esiste il sostituto cutaneo ideale. Si è visto che, in generale, i sostituti si possono dividere in due grandi categorie, biologici e sintetici. I primi mantengono intatta la struttura della matrice extracellulare, mentre quelli sintetici possono essere sintetizzati a richiesta e adattati allo scopo preciso. Ciascuna classe, dunque, presenta vantaggi e svantaggi. I sostituti biologici permettono la costruzione di un neo-derma più naturale e un'eccellente ri-epitelizzazione, caratteristica dovuta alla presenza della membrana basale. I sostituti sintetici, d'altra parte, consentono un maggior controllo sulla composizione dello scaffold. In ogni caso lo scopo ultimo è realizzare un sostituto ideale completo che provveda alla guarigione della ferita in modo efficace e senza provocare la formazione di cicatrici. Ulteriori sviluppi, in particolare negli aspetti riguardanti neo-vascolarizzazione e re-innervazione, sono importanti affinché i costrutti esplicino a pieno la loro funzione terapeutica.

Le applicazioni cliniche hanno avuto un significativo impatto nel trattamento di ulcere cutanee e bruciature. La guarigione delle lesioni croniche cutanee rappresenta ancora oggi una sfida importante per i sistemi sanitari dei paesi avanzati. In particolare, l'applicazione delle tecnologie di ingegneria tissutale ha portato allo sviluppo di sostituti cutanei che sono diventati una valida opzione per il trattamento delle lesioni croniche.

Oltre all'applicazione clinica, i modelli di cute ricostruita in vitro vengono ampiamente utilizzati come promettenti strumenti in laboratorio per studiare tutti i maggiori principi in biologia cutanea e per testare i prodotti per uso topico che vengono poi immessi nel mercato. Come modelli in vitro, questi sostituti hanno portato a buoni risultati in fisiologia, farmacologia e tossicologia. I modelli cutanei in vitro sono comunemente impiegati per identificare sostanze corrosive o tossiche e per lo studio di processi legati a varie patologie che affliggono l'organo cutaneo.

Sebbene la realizzazione in vitro di un sostituto completo sia un processo molto complesso, i rapidi progressi compiuti dall'ingegneria tissutale incoraggiano a sperare che nel vicino futuro si riesca a sviluppare un sostituto completo. Di recente infatti si è introdotto l'uso di cellule staminali, di fattori di crescita e di adesione per rendere i materiali biomimetici, migliorando la pelle ingegnerizzata sia dal punto di vista funzionale che da quello estetico.

Gli ultimi sforzi riguardano l'inclusione degli annessi cutanei, follicoli piliferi e ghiandole sudoripare, per rendere più realistico il costrutto, offrendo così un più corretto setup sperimentale per gli studi in vitro e un sostituto più funzionale per le applicazioni in vivo. Sono infatti importanti, ai fini della buona riuscita dell'impianto, la neo-vascularizzazione e la re-innervazione del letto della ferita.

Oltre all'utilizzo prettamente riabilitativo di questi sostituti è sempre più sentito l'aspetto estetico connesso all'eliminazione di rughe e difetti della pelle in un'ottica di anti-aging.

7. BIBLIOGRAFIA

- [1] Rheinwald JG, Green H, 1975, "*Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells*". Cell 6: 331-334.
- [2] Langer R, Vacanti JP, Science 1993, "*Tissue engineering*". 260:920-926.
- [3] J.K. Rose, D.N. Herndon, 1997, "*Advances in the treatment of burn patients*". Burns 23 (Suppl 1); S19–S26.
- [4] Jakson SM, Elias PM, "*Skin as an organ of protection*". In Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, Freedberg IM, Austen KF, 1993, "*Dermatology in general medicine*". McGraw-Hill, New York; 241-252.
- [5] Gagnon V, Larouche D, Parenteau-Bareil R, Gingras M, Germain L, Berthod F, J Invest Dermatol 2011, "*Hair follicles guide nerve migration in vitro and in vivo in tissue-engineered skin*". 131:1375–8.
- [6] Huang S, Lu G, Wu Y, Jirigala E, Xu Y, Ma K, Fu X, J Dermatol Sci 2012, "*Mesenchymal stem cells delivered in a microsphere-based engineered skin contribute to cutaneous wound healing and sweat gland repair*". 66:29–36.
- [7] Nelson TJ, Martinez-Fernandez A, Yamada S, Ikeda Y, Perez-Terzic C, Terzic A, Stem Cells Cloning 2010, "*Induced pluripotent stem cells: advances to applications*". 3:29–37.
- [8] Yury Gogotsi, "*Nanotubes and Nanofibers*", Taylor & Francis Group.
- [9] Seema Agarwal, Joachim H. Wendorff, Andreas Greiner, 2008, "*Use of electrospinning technique for biomedical applications*". Polymer 49; 5603–5621.
- [10] Townsend-Nicholson A, Jayasinghe S, Biomacromolecules 2006, "*Cell electrospinning: a unique biotechnique for encapsulating living organisms for generating active biological microthreads/scaffolds*". 7: 3364–9.
- [11] S. Zhang, T. Holmes, C. Lockshin, A. Rich, 1993, "*Spontaneous assembly of a self-complementary oligopeptide to form a stable macroscopic membrane*". Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 90; 3334–3338.
- [12] Kao B, Kadomatsu K, Hosaka Y, 2009, "*Construction of synthetic dermis and skin based on a self-assembled peptide hydrogel scaffold*". Tissue Eng Part A; 15: 2385–96.

- [13] Lee W, Debasitis JC, Lee VK, Lee JH, Fischer K, Edminster K, Park JK, Yoo SS, Biomaterials 2009, "*Multi-layered culture of human skin fibroblasts and keratinocytes through three-dimensional freeform fabrication*". 30: 1587–95.
- [14] Wright KA, Nadire KB, Busto P, Tubo R, McPherson JM, Wentworth BM, Burns 1998, "*Alternative delivery of keratinocytes using a polyurethane membrane and the implications for its use in the treatment of full-thickness burn injury*". 24:7-17.
- [15] Colucho G, Graham WP 3rd, Greene AE, Matheson DW, Lynch D, Arch Surg 1974, "*Human amniotic membrane as a physiologic wound dressing*". 109:370-3.
- [16] M.R. Madden, A.A. LaBruna, D.P. Hajjar, L. Staiano-Coico, 1996, "*Transplantation of cryopreserved cultured epidermal allografts*". J. Trauma 40; 743–750.
- [17] Wainwright D, Madden M, Luterman A, Hunt J, Monafó W, Heimbach D, Kagan R, Sittig K, Dimick A, Herndon D, J Burn Care Rehabil 1996, "*Clinical evaluation of an acellular allograft dermal matrix in full-thickness burns*". 17: 124–36.
- [18] Banes AJ, Compton DW, Bornhoeft J, et al, J Burn Care Rehabil 1986, "*Biologic, biosynthetic, and synthetic dressings as temporary wound covers: a biochemical comparison*". 7:96-104.
- [19] E.G. Kolokol'chikova, L.I. Budkevich, A.E. Bobrovnikov, A.K. Badikova, V.P. Tumanov, 2001, "*Morphological changes in burn wounds after transplantation of allogenic fibroblasts*". Bull. Exp. Biol. Med. 131; 89–93.
- [20] Bello YM, Falabella AF, Eaglstein WH, Am J Clin Dermatol 2001, "*Tissue-engineered skin. Current status in wound healing*". 2:305-13.
- [21] R.V. Shevchenko, S.L. James, S.E. James, 2010, "*A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction*". J. R. Soc. Interface 7; 229–258.
- [22] L. Uccioli, 2003, "*A clinical investigation on the characteristics and outcomes of treating chronic lower extremity wounds using the TissueTech Autograft System*". Int. J. Low. Extrem. Wounds 2; 140–151.
- [23] Trent JF, Kirsner RS, Int J Clin Pract 1998, "*Tissue engineered skin: Apligraf, a bi-layered living skin equivalent*". 52:408-13.
- [24] S.M. Eppler, D.L. Combs, T.D. Henry, J.J. Lopez, S.G. Ellis, J.H. Yi, B.H. Annex, E.R. McCluskey, T.F. Zioncheck, 2002, "*A target-mediated model to describe the pharmacokinetics and hemodynamic effects of recombinant human vascular endothelial growth factor in humans*". Clin. Pharmacol. Ther. 72; 20–32.

- [25] Black, A. F., Berthod, F., L'Heureux, N., Germain, L. and Auger, F. A., 1998, *FASEB J.* 12; 1331–1340.
- [26] Supp, D. M., Wilson-Landy, K. and Boyce, S. T., 2002, *FASEB J.* 16; 797–804.
- [27] M. Ponec, 2002, “*Skin constructs for replacement of skin tissues for in vitro testing*”. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54 (Suppl 1); S19–S30.
- [28] J. Draize, G. Woodard, H. Calvery, 1944, “*Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes*”. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 82; 377–390.
- [29] EU, Seventh Amendment to the EU Cosmetics Directive 76/768/EEC, in: *The European Parliament and the Council of the European Union (Ed.)*, Brussels, 2003.
- [30] T. Welss, D.A. Basketter, K.R. Schroder, 2004, “*In vitro skin irritation: facts and future. State of the art review of mechanisms and models, Toxicol*”. *In Vitro* 18; 231–243.
- [31] E. Bell, H.P. Ehrlich, D.J. Buttle, T. Nakatsuji, 1981, “*Living tissue formed in vitro and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness*”. *Science (New York)* 211; 1052–1054.
- [32] S. Huang, Y. Xu, C.Wu, D. Sha, X. Fu, 2010, “*In vitro constitution and in vivo implantation of engineered skin constructs with sweat glands*”. *Biomaterials* 31; 5520–5525.
- [33] D.M. Danilenko, 2008, “*Review paper: preclinical models of psoriasis*”, *Vet. Pathol.* 45; 563–575.
- [34] B. Bandarchi, L. Ma, R. Navab, A. Seth, G. Rasty, 2010, “*From melanocyte to metastatic malignant melanoma*”. *Dermatol. Res. Pract.* Article ID 583748, 8 pages, doi:10.1155/2010/583748.
- [35] T. Schreier, E. Degen, W. Baschong, 1993, “*Fibroblast migration and proliferation during in vitro wound healing. A quantitative comparison between various growth factors and a low molecular weight blood dialysate used in the clinic to normalize impaired wound healing*”. *Res. Exp. Med. (Berl)* 193; 195–205.
- [36] K.S. Midwood, L.V. Williams, J.E. Schwarzbauer, 2004, “*Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix*”. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36; 1031–1037.
- [37] Marghoob AA, Schoenbach SP, Kopf AW, Orlow SJ, Nossa R, Bart RS, *Arch Dermatol* 1996, “*Large congenital melanocytic nevi and the risk for the development of malignant melanoma. A prospective study*”. 132: 170e5.