



**UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA**



**DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE**

**CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA**

**“Biomateriali per il trattamento delle malattie neurodegenerative”**

**Relatore: Prof. Andrea Bagno**

**Laureanda: Anna Gasparini**

**ANNO ACCADEMICO 2022 – 2023**

**Data di laurea 21/11/2023**

## Indice

Abstract .....	4
Introduzione .....	5
Capitolo 1. Le malattie neurodegenerative: diagnosi e sintomi .....	6
1.1 Meccanismi comuni implicati nelle malattie neurodegenerative .....	7
1.1.1 Accumulo di ione calcio nel neurone .....	7
1.1.2 Aggregati proteici presenti nell'encefalo .....	8
1.1.3 Stress ossidativo .....	9
1.1.4 Disfunzione mitocondriale .....	10
1.1.5 Stato infiammatorio .....	11
1.2 Morbo di Parkinson .....	12
1.3 Morbo di Alzheimer .....	14
1.4 Sclerosi Amiotrofica Laterale .....	15
Capitolo 2. Le attuali cure per le malattie neurodegenerative .....	18
2.1 Barriera emato-encefalica .....	18
2.1.1 Struttura della BEE .....	19
2.1.1.1 Alterazioni della struttura della BEE .....	20
2.2 Cure disponibili per il Morbo di Parkinson .....	21
2.3 Cure disponibili per il Morbo di Alzheimer .....	24
2.4 Cure disponibili per la Sclerosi Laterale Amiotrofica – SLA .....	26
Capitolo 3. Trattamenti innovativi con i biomateriali .....	28
3.1 Biomateriali disponibili .....	28
3.1.1 Hydrogel .....	29
3.1.2 Biomateriali a base di carbonio – grafene .....	30
3.1.3 Biomateriali polimerici .....	31
3.1.3.1 Collagene .....	32
3.1.3.2 Acido ialuronico .....	33

3.1.3.3	Chitina e chitosano .....	34
3.1.4	Nanoparticelle per la somministrazione di farmaci al cervello.....	34
3.1.4.1	Nanoparticelle lipidiche solide .....	35
3.1.4.2	Nanoparticelle inorganiche .....	36
3.1.4.2.1	<i>Nanoparticelle d'oro</i> .....	37
3.1.4.2.2	<i>Nanoparticelle di ferro</i> .....	37
3.1.4.2.3	<i>Nanoparticelle di ossido di cerio</i> .....	38
3.1.4.2.4	<i>Nanoparticelle di solfuro di molibdeno</i> .....	40
3.1.4.2.5	<i>Nanoparticelle di silice</i> .....	41
	Conclusioni.....	42
	Bibliografia.....	43

## **Abstract**

Nella popolazione anziana le malattie neurodegenerative costituiscono un problema molto comune. Con questo termine si indica un insieme di patologie caratterizzate da un'irreversibile perdita di cellule neuronali in determinate aree del cervello. Questo è il motivo per cui le malattie neurodegenerative sono classificate come debilitanti e non curabili. Esse sono differenti nella fisiopatologia e sintomatologia: alcune causano deficit mnemonici e cognitivi, come ad esempio l'Alzheimer; altre possono influenzare la capacità di muoversi, parlare e respirare come il Parkinson o la sclerosi laterale amiotrofica (SLA).

L'ingegneria biomedica studia differenti metodi per recuperare i danni provocati da queste malattie o, quanto meno, per limitare gli effetti collaterali dovuti alle cure attuali. Questa tesi si occupa di approfondire i nuovi approcci terapeutici, realizzati con l'uso dei biomateriali, che si possono applicare con differenti metodologie: la rigenerazione neuronale e la veicolazione del farmaco in situ. Verrà posta particolare attenzione sulle nanoparticelle, gli hydrogel e i biomateriali polimerici in genere. Si tratta di nuove procedure che, sebbene rappresentino un possibile futuro e una speranza nella medicina, sono tuttora in fase di sperimentazione per poterne valutare vantaggi e svantaggi.

## **Introduzione**

Le malattie neurodegenerative sono un insieme di disturbi neurologici con manifestazioni cliniche e patologiche eterogenee che colpiscono i neuroni; esse includono il morbo di Parkinson, il morbo di Alzheimer e la Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA).

A seconda del tipo di malattia, il danno neuronale può causare deficit cognitivi, demenza, difficoltà motorie come mancanza di stabilità o incapacità di deambulazione, disturbi comportamentali e psicologici.

Questi disturbi neurologici risultano estremamente invalidanti con il passare del tempo: la persona non riesce più a camminare, a parlare e ad essere autonoma nelle attività quotidiane.

Sebbene i sintomi siano differenti, alla base delle malattie neurodegenerative sussistono dei meccanismi comuni: accumulo di ione calcio nel neurone, aggregati proteici presenti nell'encefalo, stress ossidativo, disfunzione mitocondriale ed uno stato di neuroinfiammazione. Il fattore di rischio più rilevante per lo sviluppo di una malattia neurodegenerativa è l'aumento dell'età.

Nell'ultimo secolo, il tasso di crescita della popolazione di età pari o superiore a 65 anni nei paesi industrializzati è significativamente aumentato. Si può prevedere che, nelle prossime generazioni, la percentuale di cittadini anziani raddoppierà e di conseguenza anche la percentuale di persone affette da un disturbo neurodegenerativo.

Le malattie neurodegenerative rappresentano dunque un problema sanitario significativo in tutto il mondo in quanto, ad oggi, non esistono terapie efficaci in grado di rallentare o arrestare la progressione; al momento si è in grado solamente di allievare i sintomi nel tentativo di migliorare la qualità di vita del paziente. Per questo motivo, negli ultimi anni è stata posta particolare attenzione nella medicina neuro-degenerativa, con l'obiettivo di raggiungere una terapia efficace e risolutiva.

## Capitolo 1. Le malattie neurodegenerative: diagnosi e sintomi

Le malattie neurodegenerative sono caratterizzate da un'irreversibile e progressiva perdita di cellule neuronali. Possono essere classificate in base alle caratteristiche cliniche primarie (ad esempio, demenza, parkinsonismo, o malattia del motoneurone), alla distribuzione anatomica della neurodegenerazione (ad esempio, degenerazioni frontotemporali, disturbi extrapiramidali, o degenerazioni spinocerebellari), o anomalie riscontrate tramite test genetici molecolari, che possono evidenziare i geni responsabili che causano la patologia.

I disturbi neurodegenerativi più comuni sono taupatie,  $\alpha$ -sinucleinopatie e proteinopatie TDP-43. Vi sono poi alcune patologie rare come l'amiloidosi, in cui le proteine assumono conformazioni anomale causando disfunzioni ed insufficienze organiche.

Le malattie neurodegenerative includono il morbo di Alzheimer (AD), il morbo di Parkinson (PD), la sclerosi multipla (SM), la sclerosi laterale amiotrofica (SLA) e la malattia di Huntington (HD). I trattamenti per le malattie neurodegenerative rappresentano la sfida principale nella ricerca biomedica, poiché tali trattamenti colpiscono un numero crescente di persone in una popolazione che invecchia. Inoltre, le lesioni acute esacerbano la neurodegenerazione cronica, aumentano le risposte neuroinfiammatorie sistemiche e colpiscono il sistema nervoso centrale (SNC). Secondo il rapporto dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), nei prossimi 20 anni le malattie neurodegenerative diventeranno la seconda causa di morte per l'uomo.

Il continuo fallimento dei farmaci destinati al trattamento delle malattie neurodegenerative richiede lo sviluppo di nuove opzioni terapeutiche con il più alto tasso di successo [1].

Le malattie neurodegenerative sono di varia tipologia e si manifestano in diverse modalità. Il morbo di Parkinson, ad esempio, va a colpire la mobilità del paziente ed è contraddistinto da forti tremori, rigidità ed indebolimento muscolare e difficoltà nella deambulazione. Il morbo di Alzheimer invece danneggia progressivamente la memoria. Un paziente affetto da Alzheimer, con il passare del tempo, non riconosce più i volti ed i luoghi familiari e perde totalmente autonomia nelle mansioni giornaliere, come mangiare, bere e vestirsi.

La patologia neurodegenerativa più drammatica è la sclerosi amiotrofica laterale, la SLA. La SLA degrada progressivamente i motoneuroni, il cui compito consiste nel trasferire il segnale all'esterno del sistema nervoso centrale per controllare i muscoli.

L'aspettativa di vita è molto bassa: si stima che un paziente a cui sia stata diagnosticata la SLA viva tra i 3 ai 5 anni dopo a diagnosi. Il paziente affetto da SLA perde tempestivamente le

proprie capacità motorie e, nell'ultimo stadio della malattia, risulta necessaria la ventilazione meccanica.

Sebbene queste patologie si possano presentare in modalità molto differenti, alla base vi sono dei meccanismi in comune implicati nella neurodegenerazione, illustrati brevemente nella Figura 1.1 e approfonditi nel seguente paragrafo [2][3].

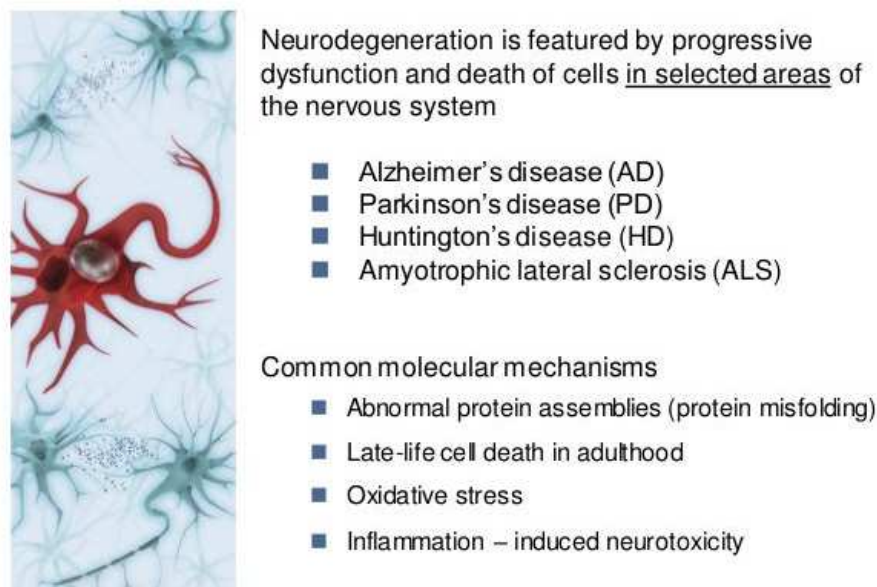


Figura 1.1: Riassunto dei meccanismi comuni nelle malattie neurodegenerative.

## 1.1 Meccanismi comuni implicati nelle malattie neurodegenerative

Sebbene i sintomi e le manifestazioni delle malattie neurodegenerative siano molti vari, alla base sussistono dei meccanismi comuni implicati nella neurodegenerazione neuronale [4].

### 1.1.1 Accumulo di ione calcio nel neurone

Il calcio è uno ione che svolge un ruolo essenziale nella contrazione muscolare ed in altri processi cellulari. Viene assorbito a livello intestinale e si deposita sulla struttura ossea di idrossiapatite. L'omeostasi del calcio è il processo attraverso cui il corpo regola la quantità di calcio nel sangue (calcemia). La sua concentrazione intracellulare deve essere inferiore a 0.1  $\mu$ molare.

Sostanze come farmaci o agenti tossici possono causare un'alterazione della concentrazione intracellulare di calcio. In particolare, alcune sostanze possono subire delle trasformazioni e generare radicali liberi che, a loro volta, possono formare specie reattive dell'ossigeno, le quali causano stress ossidativo a livello delle membrane cellulari.

Lo stress ossidativo altera l'equilibrio fisiologico causando molti danni cellulari e innescando a sua volta fenomeni intracellulari come il blocco della sintesi di ATP (adenosina trifosfato), un composto che fornisce alla cellula l'energia necessaria.

L'ATP è prodotto dai mitocondri e la sua produzione dipende dal flusso di protoni, che si spostano dallo spazio intermembrana verso la matrice mitocondriale, fortemente negativa, capace di attrarre cariche positive. Questo spostamento è reso possibile dalla differenza di carica e, quando l'omeostasi del calcio viene alterata causando un aumento della concentrazione dello ione, questa differenza di carica viene neutralizzata, in quanto lo ione calcio possiede due cariche positive. Per questo motivo la produzione di ATP viene bloccata causando molti squilibri cellulari.

L'ipercalcemia, ossia l'eccessiva concentrazione di calcio nel sangue, genera debolezza e crampi muscolari e, a livello neurologico, genera depressione e perdita di memoria.

Alcuni studi condotti da Blalock nel 2004 mostrarono una forte correlazione tra il morbo di Alzheimer e l'ipercalcemia, in particolare provano come quest'ultima possa innescare lo sviluppo della malattia [5][6].

### *1.1.2 Aggregati proteici presenti nell'encefalo*

Le proteine sono molecole di grandi dimensioni e svolgono molteplici funzioni: strutturali, immunitarie, di trasporto, ormonali ed energetiche e nel genoma umano ne può codificare circa 30.000.

Vengono sintetizzate come una sequenza lineare di aminoacidi sul ribosoma e successivamente subiscono modificazioni post-traduzionali per raggiungere il loro stato funzionale.

Il folding, ossia il ripiegamento, è il processo con cui le proteine raggiungono la loro struttura tridimensionale.

Dopo la sintesi alcune proteine assumono la corretta conformazione, altre invece si ripiegano in modo scorretto. I fattori che ostacolano il ripiegamento corretto sono la presenza di grandi quantità di macromolecole e l'esposizione a sostanze tossiche [7].

Il sistema di controllo della qualità delle proteine presente negli organismi viventi si è evoluto nel corso degli anni per garantire la corretta conformazione delle proteine, il loro trasporto e la loro degradazione. Tuttavia, un gran numero di proteine non è in grado di raggiungere o mantenere lo stato nativo e perciò si degradano.

Gli chaperoni molecolari sono proteine che guidano le altre proteine durante il corretto processo di ripiegamento e, quando le proteine misfolded (piegate in modo errato) non possono essere correttamente ripiegate da queste, vengono eliminate da un sistema definito proteosoma-



ubiquitina (UP). Questo sistema è responsabile della degradazione delle proteine misfolded o danneggiate.

I principali fattori che provocano la degradazione delle proteine sono l'invecchiamento, le mutazioni somatiche o genetiche, i cambiamenti nell'ambiente intracellulare come temperatura, pH, stress ossidativo e presenza di ioni metallici.

La mancata eliminazione delle proteine genera l'accumulo di fibrille amiloidi, strutture da cui la patologia amiloidosi prende il nome [8]. L'amiloide si deposita tra le cellule in vari organi e tessuti nel corpo sotto forma di fibrille di foglietti beta-pieghettati.

Le patologie da aggregazione proteica sono l'Alzheimer, in il cui maggior costituente delle placche amiloidi è il peptide A $\beta$  (beta amiloide), ed il Parkinson, caratterizzato dall'accumulo della proteina  $\alpha$ -sinucleina, la quale dà origine ai corpi di Lewy [9].

### *1.1.3 Stress ossidativo*

Lo stress ossidativo o squilibrio redox rappresenta l'insieme delle alterazioni che subiscono i tessuti e le cellule quando questi sono esposti ad un eccesso di agenti ossidanti.

Lo squilibrio redox deriva dall'azione di sostanze chimiche instabili altamente reattive, come i radicali liberi dell'ossigeno e dell'azoto ( ROS e RNS) e di radiazioni ionizzanti.

Qualora le difese antiossidanti della cellula fossero insufficienti a mantenere lo stato redox in equilibrio, l'eccessiva esposizione a ROS e RNS può creare danni irreversibili fino a provocare la morte della cellula.

I mitocondri svolgono un ruolo chiave nella fornitura di ATP alle cellule attraverso la fosforilazione ossidativa e nella sintesi di molecole biologiche essenziali. Nel processo di fosforilazione ossidativa hanno luogo diverse reazioni redox catalizzate da enzimi. Una fosforilazione ossidativa inefficiente può generare specie reattive dell'ossigeno (ROS), portando alla disfunzione mitocondriale. Il metabolismo redox mitocondriale, il metabolismo dei fosfolipidi e le vie proteolitiche risultano essere la fonte principale di radicali liberi.

Il normale e corretto funzionamento del sistema nervoso centrale (SNC) dipende interamente dall'integrità chimica del cervello.

L'ossigeno è una componente chiave ed è indispensabile per la sopravvivenza di un organismo. Le malattie neurodegenerative sono caratterizzate dalla disfunzione delle cellule neuronali ed il cervello, essendo la parte più attiva del corpo, è maggiormente esposto allo stress ossidativo [10].

#### *1.1.4 Disfunzione mitocondriale*

I mitocondri svolgono un ruolo importante nei processi respiratori delle cellule, nel metabolismo, nella produzione di energia, nella segnalazione intracellulare, nella produzione di radicali liberi e nell'apoptosi, ossia la morte programmata delle cellule. Questi organelli possono cambiare la loro morfologia, il loro numero e la loro funzione in reazione a situazioni fisiologiche e a fattori di stress come gli ormoni, la dieta, la temperatura e l'attività fisica.

Molte evidenze suggeriscono che i mitocondri possono regolare in modo critico la morte e la sopravvivenza delle cellule, giocano un ruolo essenziale nell'invecchiamento e sono una delle caratteristiche chiave della neurodegenerazione. Nel sistema nervoso centrale (SNC), l'apporto di energia necessaria per la sopravvivenza e l'eccitabilità dei neuroni, dipende principalmente dalle fonti mitocondriali; pertanto, il cervello è molto più vulnerabile alle disfunzioni mitocondriali.

Un'adeguata funzione dei mitocondri è fondamentale per l'attivazione di altrettanto adeguate reazioni di stress e per il mantenimento dell'omeostasi metabolica, che sono state implicate nel benessere della cellula.

Le cellule svolgono il compito di mantenere l'efficienza energetica dei mitocondri monitorando e sostituendo i mitocondri disfunzionali con nuovi organelli. Essi richiedono la replicazione e la trascrizione della sintesi proteica mitocondriale, del DNA mitocondriale (mtDNA) e di eventi strutturali distinti nel citoplasma, come la proliferazione mitocondriale, l'autofagia mitocondriale (mitofagia) e la fusione/fissione mitocondriale.

Mutazioni del mtDNA, alterazioni della dinamica mitocondriale (fusione/fissione mitocondriale, movimento, morfologia, dimensioni e trasporto), mutazioni geniche e trascrizione alterata contribuiscono alla disfunzione mitocondriale che si traduce in difetti bioenergetici. Esistono numerose prove che dimostrano l'importanza della disfunzione mitocondriale nella patogenesi di malattie come i disturbi neurodegenerativi.

In quanto organelli delle cellule eucariotiche, i mitocondri svolgono diverse funzioni, come la sintesi di ATP attraverso la trasduzione di energia. D'altra parte, i ROS sono sottoprodotti di questo processo e possono danneggiare diversi tipi di molecole causando disfunzioni mitocondriali. Pertanto, l'attività mitocondriale è un'arma a doppio taglio che può essere sia potenzialmente pericolosa che essenziale. Alcune anomalie mitocondriali sono state riconosciute in modelli animali e umani con la sindrome metabolica, come la riduzione della massa mitocondriale, l'alterazione della morfologia mitocondriale, la riduzione dell'ossidazione degli acidi grassi e la sovrapproduzione di ROS [11].

### 1.1.5 Stato infiammatorio

Una delle caratteristiche degli eventi neurodegenerativi è l'alterazione della risposta infiammatoria. È stato osservato che la neuroinfiammazione e lo stress ossidativo sono aspetti fondamentali da tenere in considerazione per quanto riguarda l'insorgenza e la progressione dei disturbi neurodegenerativi, essendo indissolubilmente legati nella loro patogenesi.

Alcuni ROS (radicali liberi dell'ossigeno) e RSN (radicali liberi dell'azoto) possono ulteriormente promuovere cascate di segnalazione intracellulare, portando ad un'aumentata espressione di geni pro-infiammatori. Pertanto, la neuroinfiammazione e lo stress ossidativo possono stimolarsi a vicenda, soprattutto nello stato di malattia.

Quando le reazioni di riduzione e ossidazione (redox) dell'organismo sono in equilibrio, la risposta infiammatoria agisce come meccanismo di difesa; tuttavia, nel caso di eventi neurodegenerativi, si verifica uno squilibrio redox. Pertanto, la risposta infiammatoria non agisce di conseguenza, generando neuroinfiammazione nel sistema nervoso centrale.

Per definizione, la neuroinfiammazione può essere descritta come la risposta infiammatoria del SNC ai fattori che agiscono contro l'omeostasi. Questa risposta comprende diversi tipi di cellule all'interno del SNC, come astrociti e microglia.

Oltre alle malattie neurodegenerative, questa risposta può essere osservata in tutti i tipi di eventi neurologici, compresi quelli ischemici, infettivi e traumatici.

Poiché svolge un ruolo così importante nell'inizio e nella progressione di queste malattie, la comprensione dei processi che avvengono tra il sistema immunitario e il SNC è fondamentale. È necessario richiamare l'attenzione sul fatto che lo stress ossidativo e la neuroinfiammazione sono due eventi patologici distinti. Tuttavia, questi due eventi si influenzano e/o causano reciprocamente nel corso della malattia. Pertanto, l'inibizione di uno di essi può determinare la soppressione dell'altro.

L'elemento principale della neuroinfiammazione è l'attivazione della microglia. Le microglia rispondono rapidamente agli squilibri dell'omeostasi cerebrale che si verificano a causa di stress, traumi, malattie o patologie. L'attivazione della microglia innesca diversi componenti infiammatori e citotossici responsabili della neuroinfiammazione e della neurodegenerazione. Tuttavia, la microglia svolge anche un ruolo benefico nel mantenimento dell'omeostasi del SNC e nel rimodellamento dei circuiti neuronali. Ad esempio, nel caso dell'Alzheimer, la microglia offre una certa neuroprotezione attraverso la rimozione fagocitica del peptide beta-amiloide A $\beta$ , il maggior costituente delle placche amiloidi. Quando la microglia perde le sue funzioni benefiche, si verificano infiammazione, perdita sinaptica e danno neuronale. Inoltre, senza l'eliminazione dell'aggregato di A $\beta$ , si nota che l'attivazione di vie di segnalazione pro-

infiammatorie promuove l'infiammazione, lo stress ossidativo e la neurodegenerazione nell'Alzheimer [12].

## **1.2 Morbo di Parkinson**

La malattia di Parkinson (PD) è un disturbo neurodegenerativo cronico e progressivo caratterizzato dalla morte precoce e prominente dei neuroni dopaminergici nella pars compacta della substantia nigra (SNpc) e dalla presenza diffusa di  $\alpha$ -sinucleina, una proteina intracellulare. La carenza di dopamina nei gangli della base porta ai classici sintomi motori parkinsoniani, ovvero bradicinesia, tremore, rigidità e successivamente instabilità posturale.

Il PD è anche associato a sintomi non motori, che possono precedere i sintomi motori di oltre un decennio. Questi sintomi non motori diventano fastidiosi negli ultimi stadi della malattia. Attualmente, il pilastro della gestione del Parkinson è la terapia farmacologica; tuttavia, le terapie sintomatiche presentano notevoli limiti nella malattia avanzata. Nonostante i notevoli progressi nel trattamento medico e chirurgico del PD, manca una terapia definitiva che modifichi la malattia.

La fisiopatologia del Parkinson comporta la perdita o la degenerazione dei neuroni dopaminergici nella SNpc e l'accumulo di corpi di Lewy, che sono aggregati intracellulari anomali contenenti proteine, come l' $\alpha$ -sinucleina e l'ubiquitina. Circa il 60-70% dei neuroni della SNpc viene perso prima che si manifestino i sintomi. Il processo patogenetico nel Parkinson coinvolge regioni del SNP (sistema nervoso periferico) e SNC, oltre ai neuroni dopaminergici della SNpc. La patologia da corpi di Lewy inizia nei neuroni colinergici e monoaminergici del tronco encefalico e nei neuroni del sistema olfattivo, ma coinvolge le regioni limbiche e neocorticali del cervello con la progressione della malattia. La perdita di neuroni dopaminergici, inizialmente limitata al SNpc, diventa più diffusa quando la malattia è ormai allo stadio terminale.

La malattia di Parkinson è definita clinicamente dalla presenza di bradicinesia in combinazione con almeno un'altra manifestazione: rigidità muscolare, tremore a riposo o instabilità posturale. I sintomi motori iniziano unilateralmente e l'asimmetria persiste per tutto il corso della malattia. I sintomi non motori sono presenti in un'ampia percentuale di pazienti. Alcuni di questi sintomi non motori possono precedere di anni l'insorgenza dei sintomi motori cardinali. Questi sintomi non motori comprendono disturbi del sonno, per esempio: risvegli frequenti, disturbo del comportamento nel sonno con movimenti oculari rapidi (RBD- Sleep Behaviour Disorder), sonnolenza diurna, iposmia, disturbi della funzione autonoma, deterioramento cognitivo, disturbi dell'umore e dolore. Si riportano segni anche di demenza, allucinazioni ed ipotensione

sintomatica. La rigidità dell'andatura, l'instabilità posturale, le cadute e il soffocamento sono purtroppo ampiamente presenti nei pazienti affetti da Parkinson.

Sebbene non vi sia consenso sulla classificazione dei sottotipi di PD, le osservazioni cliniche suggeriscono l'esistenza di due sottotipi principali: il PD a dominanza di tremore (con una relativa assenza di altri sintomi motori) e il PD non a dominanza di tremore (che comprende i fenotipi descritti come sindrome acinetico-rigida e disturbo dell'andatura con instabilità posturale, PIGD). Il Parkinson a dominanza di tremore è spesso associato a un tasso di progressione più lento e a una minore disabilità funzionale rispetto alla malattia di Parkinson a dominanza di tremore.

La diagnosi precoce risulta fondamentale, inizialmente per escludere patologie che presentano sintomi simili e successivamente per limitare i danni della neurodegenerazione. Pertanto, l'imaging funzionale è necessario per confermare la diagnosi clinica e comprendere la fisiopatologia sottostante.

La tomografia computerizzata a emissione di singolo fotone (SPECT) con <sup>123</sup>I-ioflupane (nota anche come DaTscan) è utile per valutare la densità dei terminali dopaminergici presinaptici all'interno dello striato, in quanto aiuta a differenziare il PD da disturbi che esistono senza la presenza di deficit dei terminali dopaminergici presinaptici.

La tomografia a emissione di positroni (PET) con <sup>18</sup>F-DOPAL-6-fluoro-3, 4-diidrossifenilalmina (<sup>18</sup>F-DOPA), illustrata nella Figura 1.2, valuta l'integrità dopaminergica presinaptica e riflette accuratamente i disturbi monoaminergici nel Parkinson. Un'analisi retrospettiva di 27 pazienti sottoposti a PET con <sup>18</sup>F-DOPA per sintomi motori sospetti di PD ha mostrato una sensibilità del 95,4% [13].

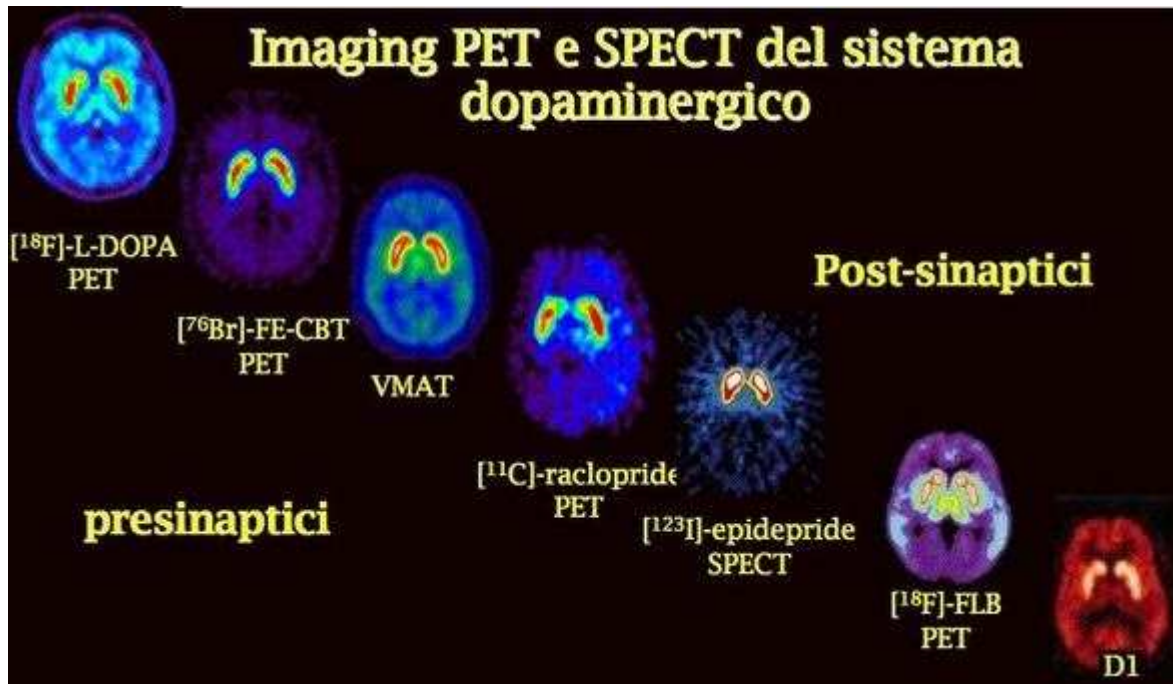


Figura 1.2: Esame PET, in paziente parkinsoniano, con l'impiego del radiofarmaco 18F-di-idrossi-fenil-alanina(18F-DOPA).

### 1.3 Morbo di Alzheimer

La malattia di Alzheimer è una patologia cerebrale che distrugge lentamente la memoria e le capacità di pensiero e, infine, la capacità di svolgere le attività più semplici. Nella maggior parte delle persone affette da questa malattia, i sintomi compaiono per la prima volta intorno ai 60 anni nel caso di insorgenza tardiva. L'Alzheimer ad esordio precoce si manifesta tra i 30 e i 60 anni ed è molto raro. La malattia di Alzheimer è la causa più comune di demenza tra gli anziani. I suoi sintomi comprendevano perdita di memoria, problemi di linguaggio e comportamento imprevedibile. Esaminando un cervello post-mortem, si notano molti grumi anomali, detti placche amiloidi, e fasci di fibre aggrovigliate, chiamati grovigli neurofibrillari o tau, illustrati nella Figura 1.3. Queste placche e grovigli nel cervello sono tuttora considerate alcune delle caratteristiche principali della malattia di Alzheimer. Un'altra caratteristica è la perdita di connessioni tra le cellule nervose del cervello. I neuroni trasmettono messaggi tra le diverse parti del cervello e dal cervello ai muscoli e agli organi del corpo. Si ritiene che anche molte altre complesse alterazioni cerebrali svolgano un ruolo nell'Alzheimer.

Il danno si verifica inizialmente nelle parti del cervello coinvolte nella memoria, tra cui la corteccia entorinale e l'ippocampo. In seguito, il danno interessa le aree della corteccia cerebrale, come quelle responsabili del linguaggio, del ragionamento e del comportamento sociale. Alla fine, molte altre aree del cervello vengono danneggiate.

I problemi di memoria sono in genere uno dei primi segni della malattia di Alzheimer, anche se i sintomi iniziali possono variare da persona a persona. Anche il declino di altri aspetti del pensiero, come la capacità di trovare le parole giuste, i problemi visivi/spaziali e la compromissione del ragionamento o della capacità di giudizio, possono segnalare le primissime fasi della malattia di Alzheimer. Il decadimento cognitivo lieve (MCI- Mild Cognitive Impairment) è una condizione che può essere un segno precoce dell'Alzheimer, ma non tutte le persone affette da MCI svilupperanno la malattia.

Le persone affette da Alzheimer hanno difficoltà a svolgere attività quotidiane come mangiare, bere e vestirsi. Possono fare sempre le stesse domande, perdersi facilmente, perdere gli oggetti o metterli in posti strani e trovare confuse anche le cose più semplici.

Con il progredire della malattia, alcune persone diventano preoccupate, arrabbiate o violente [14].

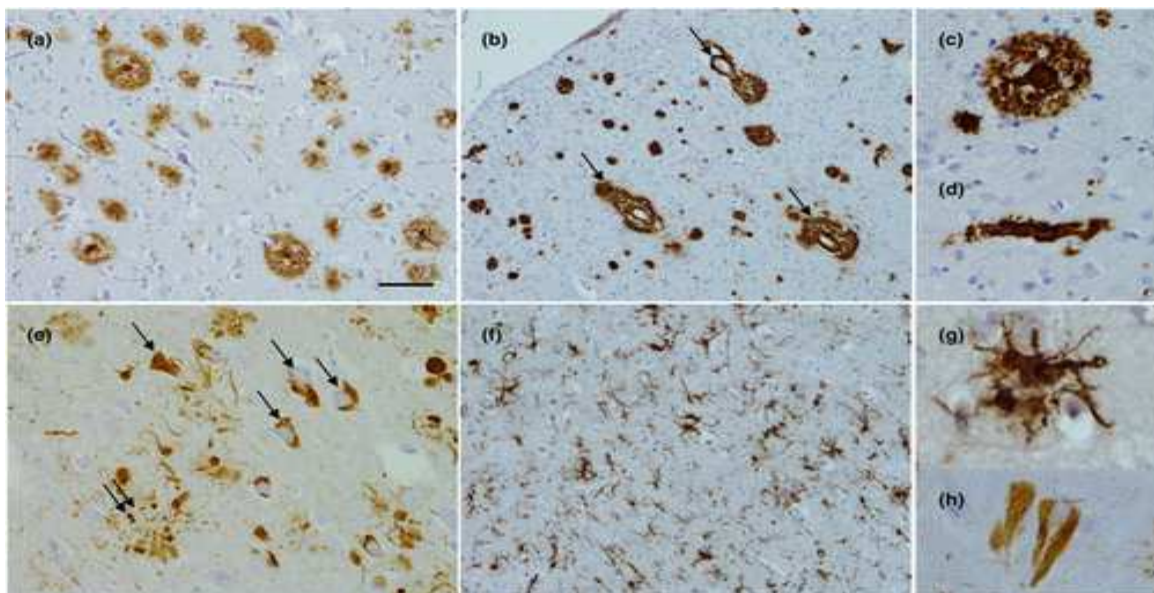


Figura 1.3: L'analisi immunoistochimica dell'A $\beta$  evidenzia le placche nella corteccia frontale (a) e l'angiopatia amiloide cerebrale (CAA) in cui l'A $\beta$  si accumula all'interno dei vasi sanguigni (b). Una placca con nucleo di A $\beta$  è mostrata a maggiore ingrandimento in (c), che mostra un nucleo centrale. Nella CAA grave l'A $\beta$  si accumula nei capillari (d). L'immunoistochimica della Tau dimostra la presenza di grovigli neurofibrillari (e, h). La neuroinfiammazione è una caratteristica prominente nella malattia di Alzheimer e ciò è evidente dal numero di microglia reattive in (f) e (g).

#### 1.4 Sclerosi Amiotrofica Laterale

La sclerosi laterale amiotrofica (SLA) è una malattia che comporta il progressivo deterioramento e la perdita di funzione dei motoneuroni del cervello, illustrati nella Figura 1.4, e del midollo spinale, con conseguente paralisi.

La SLA colpisce circa 16.000 persone, con una prognosi di sopravvivenza di 2-5 anni. Esistono due tipi di SLA differenziati dalla genetica: familiare e sporadica. La diagnosi viene determinata escludendo altre condizioni e utilizzando esami clinici, test di laboratorio e studi di conduzione nervosa/elettromiografia. Grazie alla raccolta di informazioni derivanti dalla partecipazione dei pazienti con SLA ai registri, sono stati scoperti biomarcatori e geni associati alla SLA. Le migliori pratiche per la gestione della SLA includono un approccio interdisciplinare volto a rispondere alle esigenze e ai desideri fisici e psicologici dei pazienti e dei loro familiari e caregiver.

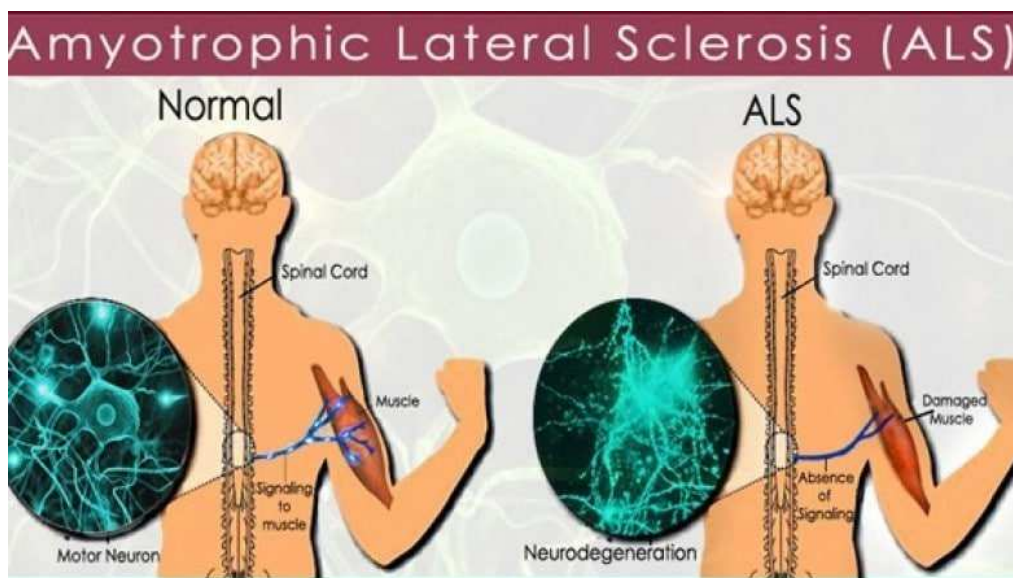


Figura 1.4: La SLA è caratterizzata dal danno ai motoneuroni, che porta a debolezza e atrofia muscolare.

La mancanza di nutrimento porta all'atrofia, o deperimento muscolare. L'aggettivo "laterale" indica le aree in cui si trovano i nervi che segnalano i muscoli nel midollo spinale; il termine "sclerosi" indica la cicatrizzazione o l'indurimento di questa regione.

I motoneuroni sono raggruppati in popolazioni inferiori e superiori. La popolazione inferiore è localizzata nel midollo spinale e nel tronco encefalico, mentre la popolazione superiore è localizzata nella corteccia motoria. L'interruzione dei motoneuroni superiori provoca riflessi bruschi e una coordinazione rallentata degli arti con spasticità e rigidità dei muscoli. L'interruzione dei motoneuroni inferiori si manifesta dapprima con contrazioni muscolari spontanee o fascicolazioni, per poi atrofizzarsi progressivamente quando si perdono le sinapsi che collegano i muscoli. Quando i motoneuroni del midollo spinale e del tronco encefalico muoiono, le radici ventrali si assottigliano e i muscoli degli arti, della lingua e dell'orofaringe diventano amiotrofici. Tuttavia, un terzo dei pazienti è affetto da malattia bulbare, che si



manifesta con difficoltà nel parlare, masticare o deglutire. I segni della malattia bulbare includono disartria, debolezza facciale, debolezza che spinge la lingua verso l'esterno (pulsione), scarsa elevazione del palato, difficoltà di masticazione, deglutizione compromessa e, più tipicamente, fascicolazioni e atrofia della lingua.

Nei processi spinali, la degenerazione dei neuroni corticospinali provoca la cicatrizzazione dei tratti laterali del midollo spinale. Con il progredire della SLA si depositano inclusioni, o proteine aggregate, costituite da motoneuroni spinali rimpiccioliti in forma rotonda o filiforme. Queste inclusioni citoplasmatiche diventano ubiquitinate nella SLA. Le proteine citoplasmatiche sono comunemente presenti nei motoneuroni di pazienti sporadici e di pazienti con SLA familiare. Poiché la SLA ha molte varianti, alcuni aggregati sono presenti solo in particolari sottotipi di SLA.

La prognosi di sopravvivenza nei pazienti affetti da SLA è di 2-5 anni. Nonostante questa prognosi infausta, il 20% dei pazienti vive per 5 anni, il 10% per 10 anni e il 5% per 20 anni o più. I pazienti con un'età maggiore all'esordio dei sintomi, con la SLA a esordio bulbare, con un punteggio più basso alla scala di valutazione funzionale della SLA e con una disfunzione precoce dei muscoli respiratori, hanno una probabilità di sopravvivenza inferiore. Infatti, procrastinare l'avvio della corretta terapia può causare la comparsa di disturbi irreversibili [15].

## **Capitolo 2. Le attuali cure per le malattie neurodegenerative**

I disturbi neurodegenerativi, come la malattia di Parkinson (PD), la malattia di Alzheimer (AD), la malattia di Huntington (HD), la sclerosi laterale amiotrofica (SLA) e la demenza frontotemporale (FTD), sono caratterizzati da una progressiva perdita di struttura, funzione o numero di neuroni nel cervello o nel midollo spinale. Purtroppo, le opzioni terapeutiche attualmente disponibili non sono sufficienti ad arrestare i processi neurodegenerativi. La complessità dei meccanismi associati alla perdita neuronale e le cause incerte di queste malattie ostacolano notevolmente la comprensione dei processi patogenetici e il conseguente sviluppo di trattamenti efficaci. Inoltre, la difficoltà di colpire la diffusa morte delle cellule neuronali, unita alla mancanza di una robusta capacità rigenerativa del sistema nervoso centrale (SNC) e alle enormi limitazioni della stragrande maggioranza dei farmaci (il 98% dei farmaci a piccole molecole e il 100% di quelli a grandi molecole) per quanto riguarda l'attraversamento della barriera emato-encefalica (Blood–Brain Barrier, BBB), aumentano ulteriormente la difficoltà di trattare queste malattie.

La perdita di qualità della vita, il costo delle cure e la mancanza di terapie efficaci rappresentano un enorme fardello per molte persone affette da queste malattie neurodegenerative. Le cure al momento disponibili purtroppo si limitano esclusivamente a ridurre i sintomi delle malattie neurodegenerative, rendendo meno difficoltosa la convivenza con la patologia. Tuttavia gli attuali farmaci presentano molti effetti collaterali, come allucinazioni, disturbi del sonno o problemi a livello di stomaco, come ulcere.

Diventa quindi necessario ricercare nuove strategie che, oltre ad alleviare i sintomi della malattia, portino ad una guarigione quantomeno parziale. I farmaci di nuova generazione presentano come obiettivo la rigenerazione neuronale, ossia sostituire il tessuto nervoso morto o gravemente danneggiato con tessuto di nuova formazione [16].

### **2.1 Barriera emato-encefalica**

La barriera emato-encefalica (BEE) rappresenta una struttura di protezione per il cervello, in quanto regola e controlla selettivamente il passaggio di sostanze tra cervello e sangue, bloccando quelle sostanze potenzialmente nocive e pericolose che potrebbero causare danni al sistema nervoso.

La barriera fisiologica è coordinata da una serie di proprietà fisiche, di trasporto e metaboliche possedute dalle cellule endoteliali (EC) che formano le pareti dei vasi sanguigni, e queste proprietà sono regolate dalle interazioni con diverse cellule vascolari, immunitarie e neurali.

Capire come queste diverse popolazioni cellulari interagiscono per regolare le proprietà della barriera è essenziale per comprendere il funzionamento del cervello in condizioni di salute e di malattia.

I vasi del SNC sono vasi continui nonfenestrati, ma possiedono anche una serie di proprietà aggiuntive che consentono loro di regolare strettamente il movimento di molecole, ioni e cellule tra il sangue e il SNC.

La natura restrittiva della BEE costituisce un ostacolo per la somministrazione di farmaci al sistema nervoso centrale e, pertanto, sono stati compiuti notevoli sforzi per generare metodi per modulare o bypassare la BEE per la somministrazione di terapie.

La disfunzione della BEE può portare alla disregolazione degli ioni, all'alterazione dell'omeostasi di segnalazione e all'ingresso di cellule e molecole immunitarie nel SNC, processi che portano alla disfunzione e alla degenerazione neuronale [17].

### *2.1.1 Struttura della BEE*

La barriera emato-encefalica è costituita da un endotelio continuo, ossia senza interruzioni tra una cellula e l'altra. L'endotelio svolge la funzione di rivestire l'interno dei vasi sanguigni.

I vasi sanguigni sono costituiti da due tipi di cellule principali: le cellule endoteliali (endothelial cells, ECs) che formano le pareti dei vasi sanguigni, e le cellule murali che si trovano sulla superficie abluminale dello strato EC. La compattezza è dovuta al fatto che le cellule endoteliali vengono tenute unite tra di loro attraverso giunzioni cellulari occludenti (Tight Junction, TJ) e, grazie a questa caratteristica, il passaggio selettivo di sostanze dal flusso sanguigno ai neuroni avviene con maggior efficacia.

Gli astrociti, cellule gliali, sono fondamentali nella formazione della BEE ed influenzano i processi di diffusione. Essi possiedono dei prolungamenti, definiti peduncoli astrocitari, che circondano le cellule endoteliali e hanno il compito di fornire la funzione di sostegno ed isolamento.

Le giunzioni serrate sono formate da proteine, in particolare occludina e claudina.

E' presente infine una spessa membrana basale continua costituita dai periciti. I periciti (PC) sono cellule che si trovano sulla superficie abluminale del tubo endoteliale microvascolare e sono inglobati nella membrana basale.

Le cellule murali comprendono le cellule muscolari lisce vascolari che circondano i grandi vasi e i periciti, che ricoprono in modo incompleto le pareti endoteliali della microvascolatura. Queste caratteristiche sono riassunte nella Figura 2.1 [18].

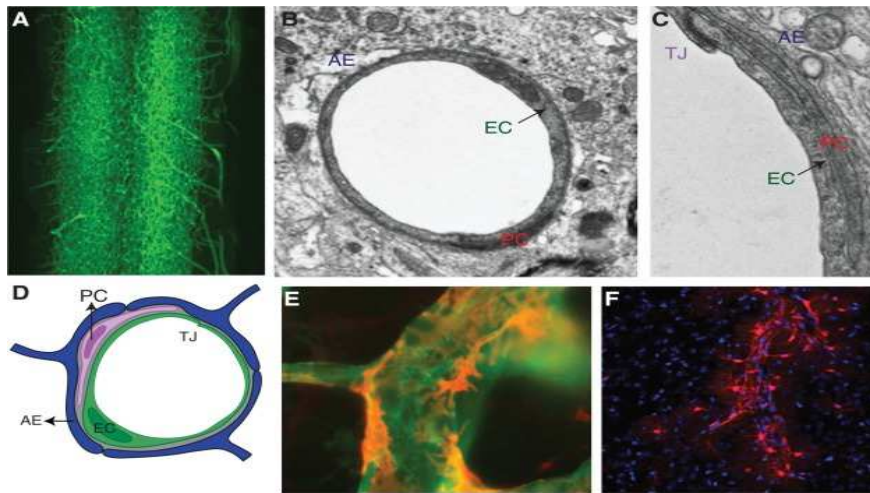


Figura 2.1: Struttura della BEE: (A) Compattezza dell'endotelio.(B)(C)(D) la cellula endoteliale EC, la giunzione stretta TJ, i periciti PC, peduncoli astrocitari AE. (E) immagine fluorescente che illustra in verde le cellule endoteliali e in giallo i periciti. (F) astrociti che formano BEE insieme ai vasi sanguigni

### 2.1.1.1 Alterazioni della struttura della BEE

L'interruzione della BEE si osserva in molti disturbi neurologici diversi, tra cui la SM, l'ictus, la malattia di Alzheimer (AD), l'epilessia e le lesioni cerebrali traumatiche. L'imaging funzionale di pazienti umani e l'analisi di campioni cerebrali post-mortem hanno identificato la rottura patologica della barriera in diverse malattie neurologiche. Inoltre, il lavoro con modelli animali di malattia e con modelli di BEE in coltura cellulare ha permesso di identificare alcuni dei meccanismi molecolari che causano alterazioni della BEE. Questa disfunzione può portare all'edema, all'interruzione dell'omeostasi ionica, all'alterazione della segnalazione e all'infiltrazione immunitaria che può portare alla disregolazione neuronale e, infine, alla degenerazione. Sebbene la disfunzione della BEE sia spesso secondaria all'insulto primario in queste malattie, in alcuni casi - tra cui la SM, l'epilessia e l'Alzheimer - è stata suggerita come causa.

La disfunzione delle ECs vascolari cerebrali e la tras migrazione dei leucociti (globuli bianchi) attraverso la BEE partecipano probabilmente allo sviluppo dell'AD, del morbo di Parkinson (PD) e di altre malattie neurodegenerative, come si può osservare nella Figura 2.2.

Poiché la funzione di resistenza multifarmaco a livello della BEE diminuisce con l'età, la riduzione della clearance dei composti neurotossici, ossia la capacità di eliminare un farmaco dalla circolazione sistemica, e l'aumento dello stress ossidativo nel cervello aumentano il rischio di patologia neurodegenerativa.

Studi di risonanza magnetica (MRI), risonanza magnetica funzionale dipendente dal livello di ossigeno nel sangue (Blood Oxygen Level Dependent, BOLD), tomografia a emissione di fluorodesossiglucosio (FDG-PET) e tomografia computerizzata a emissione di singolo fotone

(SPECT) nell'uomo mostrano che il flusso sanguigno cerebrale è significativamente ridotto prima nel decadimento cognitivo lieve e poi nell'AD.

Nell'AD, queste vie di clearance sembrano essere alterate, il che si ipotizza porti all'accumulo di A $\beta$  (peptide beta-amiloide) solubile nello spazio perivascolare e alla formazione di A $\beta$  oligomerica tossica. La deposizione di A $\beta$  nello strato delle cellule muscolari lisce vascolari e la formazione di placche di A $\beta$  intorno ai vasi di pazienti affetti da AD sono state ben documentate e partecipano alla patologia dell'angiopatia amiloide cerebrale, un'entità fortemente legata all'AD.

Nei pazienti con AD sono stati segnalati anche difetti vascolari focali nel SNC, come la "regressione" vascolare, la riduzione della densità capillare, l'accumulo di collagene e di perlecano (proteoglicano) nella lamina basale, il ridotto contenuto mitocondriale e la perdita delle giunzioni aderenti e delle giunzioni strette. Questi fenomeni potrebbero essere causati dall'accumulo di A $\beta$  e dalla disfunzione della BEE, anche se non è stato dimostrato [18][19].

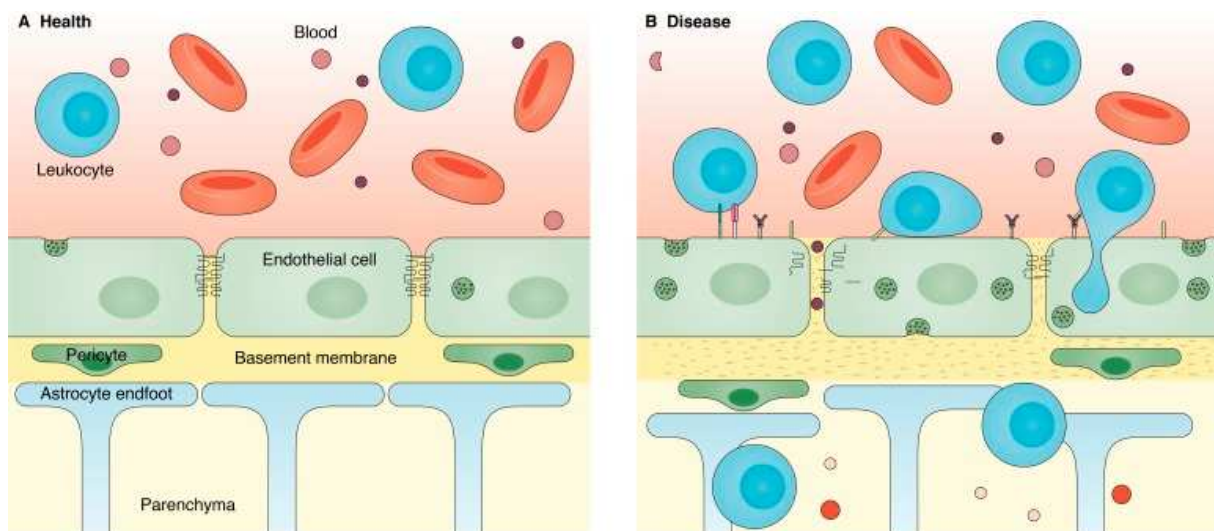


Figura 2.2:( A) In salute, le EC del SNC presentano TJ, bassi tassi di transitosi e bassa espressione di molecole di adesione leucocitaria. I pericitici incorporati nella membrana basale contribuiscono a mantenere la barriera e le estremità degli astrociti contattano la membrana basale. (B) Nella malattia, le TJ sono internalizzate o down-regolate, i tassi di transitosi aumentano, l'aumento dell'espressione delle molecole di adesione leucocitaria porta a un maggiore stravasamento di leucociti, la membrana basale si degrada e i pericitici e gli astrociti coprono meno strettamente le EC.

## 2.2 Cure disponibili per il Morbo di Parkinson

La diagnosi del morbo di Parkinson (PD) si basa esclusivamente sui sintomi clinici (bradicinesia, tremore a riposo, rigidità e instabilità posturale). La risonanza magnetica, altri studi di imaging ed esami di laboratorio vengono utilizzati per escludere altre condizioni.

La risonanza magnetica viene eseguita spesso nel PD e viene utilizzata principalmente per valutare le cause strutturali (ad esempio, malattie vascolari, tumori, ecc.) e altre cause neurodegenerative del parkinsonismo.

Il PD può essere in comorbidità con altre patologie e i medici devono essere cauti nel non interpretare i risultati positivi delle neuroimmagini strutturali come prove contro la diagnosi di PD quando la sindrome clinica è poco chiara.

L'imaging SPECT (tomografia a emissione di fotone singolo) che utilizza traccianti marcati radioattivamente che legano il trasportatore di dopamina striatale presinaptico (DaT) può essere utile per valutare l'integrità delle vie dopaminergiche nigrostriatali, che sono caratteristicamente disfunzionali nei disturbi degenerativi parkinsoniani. Un segnale SPECT ridotto all'interno dello striato suggerisce una disfunzione in questa via, poiché la DaT è ridotta nei terminali presinaptici come risultato della degenerazione neuronale. Questa tecnica tomografica è utile per distinguere il PD da altre cause di parkinsonismo che non colpiscono i neuroni dopaminergici nigrostriatali (ad esempio, tremore essenziale, parkinsonismo indotto da farmaci e vascolare), ma non dal parkinsonismo di altri disturbi degenerativi (ad esempio, atrofia multisistemica SMA, la paralisi sopranucleare progressiva PSP, la degenerazione cortico basala CBD) [20].

Inoltre, le sottoregioni dello striato sembrano perdere i loro input dopaminergici durante le fasi precliniche della malattia, mentre la perdita di input dopaminergici nell'intero putamen è correlata alla progressione della malattia.

La causa principale delle manifestazioni cliniche del Parkinson risulta essere la riduzione della trasmissione dopaminergica imputabile alla degenerazione delle cellule neuronali presenti nella sostanza nera del cervello. Per il morbo di Parkinson sono disponibili diversi principi attivi che, seppur non siano in grado di arrestare la malattia, possono contribuire a migliorare la qualità di vita del paziente.

Nel cervello di un malato di Parkinson si osserva una carenza di dopamina. Ad istinto si potrebbe pensare di somministrare direttamente la dopamina nel paziente. Il problema però di questa terapia consiste nel fatto che la dopamina pura non è in grado di giungere al cervello, perché non oltrepassa la barriera emato-encefalica. In sostituzione alla dopamina, è possibile assumere la levodopa (L-DOPA), il suo precursore, in grado di attraversare questa barriera e giungere perciò al cervello, dove esercita la propria attività terapeutica [21].

In seguito si utilizzano agonisti della dopamina, inibitori delle catecol-o-metil transferasi (comt), anticolinergici e bloccanti del glutammato.

Essenziale è l'accertamento diagnostico e l'inizio della terapia: infatti la terapia di ultima generazione mira soprattutto alla protezione delle cellule nervose, sottoposte agli attacchi ossidativi.

Quando viene assunto per via orale, il farmaco levodopa è in grado di oltrepassare la barriera emato-encefalica e, raggiunto il cervello, si trasforma in dopamina. La dopamina è sempre reperibile in associazione ad altri principi attivi, quali la carbidopa e l'entacapone, che impediscono alla levodopa di trasformarsi in dopamina prima di raggiungere il cervello.

La posologia deve essere regolata durante il corso della terapia: tipica di questo farmaco è infatti la perdita progressiva d'efficacia terapeutica. Tra gli effetti più comuni si riscontrano le discinesie, ossia spasmi muscolari e l'ipotensione.

Gli agonisti della dopamina sono in grado di mimare gli effetti del neurotrasmettitore endogeno dopamina, la cui diminuzione della trasmissione è imputata essere la principale causa delle manifestazioni cliniche del morbo di Parkinson.

La somministrazione di questi farmaci non è assolutamente efficace in terapie a lungo termine. Infatti questi farmaci provocano allucinazioni, sonnolenza, ritenzione idrica e vertigini.

Gli inibitori delle catecol-o-metil transferasi sono farmaci indicati per prolungare l'effetto terapeutico della levodopa-carbidopa, interagendo e bloccando l'enzima che distrugge la levodopa.

Fra i principi attivi utilizzati contro il morbo di Parkinson si ricorda l'entacapone e il tolcapone, farmaci potenti ma altamente pericolosi per i danni che provocano al fegato.

La stimolazione cerebrale profonda (DBS- Deep Brain Stimulation) può alleviare le fluttuazioni motorie e le discinesie nei pazienti con PD avanzato e refrattario ai farmaci. La DBS fornisce ulteriori benefici per il tremore, la rigidità e la bradicinesia, ma è improbabile che l'andatura e l'equilibrio migliorino e la cognizione può peggiorare (in particolare la fluenza verbale). Gli elettrodi posizionati nel globus pallidus internus o nel nucleo subtalamico regolano gli impulsi neurali anomali, alleviando così i sintomi motori.

La DBS può ridurre la dose o gli effetti avversi dei farmaci per la PD, ma le complicazioni come emorragia, infezione e migrazione dell'elettrocattetero devono essere prese in considerazione quando si decide per il trattamento con DBS.

Anche i trattamenti non farmacologici, come le terapie logopediche, fisiche e l'utilizzo di attività manuali e ludiche devono essere presi in considerazione a seconda dei sintomi del paziente [22].

### **2.3 Cure disponibili per il Morbo di Alzheimer**

L'Alzheimer (AD) tipico (definito anche forma amnestica o limbica) è caratterizzato dall'insorgenza insidiosa e dalla progressione graduale della perdita di memoria in associazione ad altri domini cognitivi (spesso la funzione visuo-spaziale ed esecutiva) che porta a una perdita di indipendenza funzionale. L'amnesia riscontrata nell'AD tipico colpisce principalmente la memoria dichiarativa episodica, i ricordi autobiografici che sono associati a eventi, tempi, luoghi ed emozioni specifici, e di solito è più evidente per i ricordi recenti all'inizio del decorso della malattia. Questo modello di perdita di memoria riflette una disfunzione delle strutture temporali mesiali e si manifesta in numerosi modi. Le persone possono sbagliare a collocare gli oggetti, ripetere conversazioni o domande o avere difficoltà a tenere traccia di date e appuntamenti. I medici possono valutare formalmente la memoria chiedendo ai pazienti di ricordare e riconoscere un elenco di parole o oggetti o di raccontare una breve storia. Altri tipi di memoria (ad esempio, la memoria procedurale) che vengono elaborati al di fuori delle strutture dell'ippocampo e del paraippocampo sono solitamente risparmiati nell'AD.

Esistono diversi criteri diagnostici formali per l'AD, che variano per l'enfasi posta sull'uso dei biomarcatori nella diagnosi della malattia. I criteri del National Institute on Aging e dell'Alzheimer's Association (NIA-AAS) consentono di diagnosticare l'Alzheimer su basi puramente cliniche (compresi i fenotipi atipici), con l'utilizzo di biomarcatori a supporto e per aumentare la certezza diagnostica della fisiopatologia sottostante, mentre un International Working Group (IWG) richiede sia l'evidenza dei biomarcatori sia un fenotipo clinico suggestivo per formulare la diagnosi [23].

Negli ultimi anni sono stati compiuti grandi progressi nello sviluppo di biomarcatori per individuare l'AD di base. Questi includono sia i marcatori della fisiopatologia dell'AD (ad esempio, l'aumento della formazione di placche di A $\beta$ 1-42 e la deposizione di proteina tau fosforilata) sia quelli che rivelano le lesioni neuronali che si verificano in una distribuzione anatomica tipica dell'AD (ad esempio, la risonanza magnetica strutturale [MRI], la tomografia a emissione di fluorodesossiglucosio [FDG]-positroni [PET]).

La risonanza magnetica strutturale dei pazienti con AD clinica mostra un'atrofia sproporzionata dell'ippocampo e delle cortecce temporale mesiale, temporoparietale laterale e cingolata posteriore/precuneo bilateralmente, con il reperto più caratteristico dell'atrofia temporale mesiale. Il grado di atrofia alla RM riflette la gravità della patologia e l'accumulo di grovigli neurofibrillari.

Attualmente non esistono trattamenti farmacologici modificanti la malattia, perciò la gestione medica dell'AD mira quindi a migliorare i sintomi del paziente e a ottimizzare la qualità di vita



del paziente e di chi lo assiste. L'acetilcolina (ACh), un neurotrasmettitore ampiamente distribuito e noto per migliorare la cognizione, è ridotta nei pazienti con AD.

L'aumento del livello di ACh attraverso l'uso di inibitori dell'acetilcolinesterasi (ad esempio, donepezil, rivastigmina e galantamina) è stato associato a un miglioramento della cognizione rispetto al placebo.

La memantina, un antagonista dei recettori N-metil-d-aspartato (NMDA) che si ritiene agisca sopprimendo l'eccitotossicità mediata dal glutammato, ha dimostrato di ridurre il deterioramento clinico su diverse scale in pazienti con AD da moderata a grave rispetto ai controlli ma non in pazienti con malattia lieve. La combinazione di inibizione dell'acetilcolinesterasi e memantina può avere un beneficio marginale rispetto al trattamento con un singolo farmaco, anche se non è stato dimostrato un miglioramento degli esiti funzionali. Inoltre, i benefici relativamente modesti di questi trattamenti devono essere considerati insieme ai potenziali effetti collaterali di ciascuna opzione. Il controllo dei fattori di rischio vascolare (ad esempio, ipertensione, iperlipidemia, apnea ostruttiva del sonno) è importante per prevenire e trattare il deterioramento cognitivo vascolare. I pazienti affetti da AD possono peggiorare improvvisamente a causa di una condizione medica sovrapposta (per esempio, un'infezione, un disturbo metabolico) e un rapido deterioramento in questi pazienti giustifica una valutazione per queste eziologie.

I sintomi neuropsichiatrici sono comuni nell'AD e la gestione non farmacologica di questi sintomi è preferibile quando possibile. Le manifestazioni psichiatriche o comportamentali dell'AD rispondono talvolta ai trattamenti sintomatici standard (inibitori dell'acetilcolinesterasi o memantina), ma spesso richiedono un trattamento con farmaci psichiatrici. Gli inibitori selettivi della ricaptazione della serotonina (SSRI – Selective Serotonin Reuptake Inhibitor) con scarse proprietà anticolinergiche (ad esempio, citalopram, escitalopram, fluoxetina) possono trattare la depressione, anche se le prove a sostegno sono limitate [24].

I farmaci neurolettici (tranquillanti) dovrebbero essere evitati quando possibile, data la loro efficacia limitata e l'aumento del rischio di mortalità; tuttavia, a volte questi farmaci sono necessari per i fenotipi comportamentali gravi quando i trattamenti non farmacologici o di altro tipo non hanno successo.

Gli interventi non farmacologici, come la riabilitazione cognitiva e l'esercizio fisico, in alcuni casi aiutano a trattare i pazienti con demenza. Anche un impegno sociale e mentale attivo può essere utile.

## **2.4 Cure disponibili per la Sclerosi Laterale Amiotrofica – SLA**

In genere, il decorso della sclerosi laterale amiotrofica (SLA) è rapido e la maggior parte dei pazienti muore entro 3-5 anni dall'esordio dei sintomi a causa di un'insufficienza respiratoria. Sebbene la malattia sia considerata un tipo raro di neurodegenerazione dei motoneuroni, il numero di pazienti affetti da SLA è in rapido aumento a causa dell'invecchiamento della popolazione. La maggior parte dei pazienti ha un'età compresa tra i 50 e i 75 anni al momento della diagnosi e, secondo le stime, entro il 2040 saranno 400.000 i pazienti affetti da SLA in tutto il mondo. Circa il 10% dei pazienti affetti da SLA ha una storia familiare di malattia, mentre il resto dei casi è classificato come sporadico. La fisiopatologia della SLA - familiare o sporadica - non è chiara, pertanto sono disponibili pochi trattamenti efficaci. Riluzolo ed edaravone sono i trattamenti attualmente approvati per la malattia. Il Riluzolo prolunga la sopravvivenza al massimo di 2-3 mesi, con scarsi effetti sulla qualità della vita, mentre l'edaravone migliora leggermente la mobilità dei pazienti, ma l'effetto sulla sopravvivenza è sconosciuto. La scarsità di trattamenti efficaci giustifica una maggiore ricerca genetica e molecolare sui meccanismi alla base della SLA per analizzare il processo della malattia a livello cellulare [25].

Dal 2014 sono stati identificati sette nuovi geni associati alla SLA: MATR3, CHCHD10, TBK1, TUBA4A, NEK1, C21orf2 e CCNF. La rapida identificazione di numerosi nuovi geni associati alla SLA riflette i miglioramenti delle tecnologie di sequenziamento e, soprattutto, offre l'opportunità di comprendere meglio la malattia. Questi progressi sono fondamentali per lo sviluppo di trattamenti modificanti la malattia.

Ad oggi non è disponibile un singolo test diagnostico per la SLA. Infatti vengono eseguiti diversi esami clinici, come elettromiografia, risonanza magnetica, puntura lombare prima di raggiungere una diagnosi corretta.

Sebbene una classificazione di SLA clinicamente definita comporti, in media, una prognosi peggiore rispetto alla SLA clinicamente possibile, un paziente può essere minimamente disabile con SLA ed un altro può morire. Sono stati proposti anche sistemi di stadiazione che hanno lo scopo di informare sulla progressione della malattia e sulla prognosi e stanno iniziando a guadagnare terreno e ad essere accettati.

Per i pazienti con un'anamnesi di debolezza progressiva e un esame elettromiografico EMG, il quale fornisce informazioni sullo stato dei motoneuroni, la valutazione diagnostica può essere mirata. Devono essere eseguiti studi di conduzione nervosa, i quali dimostrano in genere la conservazione delle risposte sensoriali con ampiezze motorie normali o ridotte.

Poiché può verificarsi una polineuropatia sensoriale in comorbidità, ossia il malfunzionamento simultaneo di molti nervi periferici, le risposte sensoriali anormali non devono escludere la diagnosi di SLA e devono essere considerate in proporzione ai risultati motori.

L'EMG ad ago deve dimostrare segni di denervazione attiva, ossia quando il segnale elettrico che arriva al muscolo si interrompe, insieme alla denervazione cronica in più miotoni, i quali rappresentano i tessuti che costituiscono i muscoli [26].

Oltre alla valutazione elettrodiagnostica e alle neuroimmagini, in alcuni scenari clinici possono essere necessari altri test limitati per escludere diagnosi particolari. Infatti la miopatia racchiude un insieme di patologie che causano danni ai muscoli volontari. I sintomi sono molto simili a quelli della SLA, come crampi muscolari, perdita di peso e paralisi. La differenza sussiste nel fatto che la miopatia coinvolge generalmente i muscoli volontari, tranne il cuore per il quale si parla di cardiomiopatia; patologie come la SLA coinvolgono il sistema nervoso centrale [27].

## **Capitolo 3. Trattamenti innovativi con i biomateriali**

Come osservato nel Capitolo 2, le terapie attuali consentono soltanto di trattare i sintomi delle malattie neurodegenerative, ma non riescono a rallentare la progressione. L'obiettivo attuale è quello di sviluppare terapie che possano fermare o quantomeno rallentare il processo neurodegenerativo; queste terapie potrebbero non solo alleviare i sintomi, ma anche limitare la consistente perdita di neuroni causata dalle malattie. Così facendo, i pazienti svilupperebbero la disabilità ad un ritmo molto più lento ed anche la sopravvivenza media migliorerebbe.

Recentemente, si è pensato di fare ricorso all'utilizzo di specifici biomateriali per implementare approcci terapeutici innovativi per la cura delle malattie neurodegenerative. La scelta del biomateriale corretto si basa su proprietà fisiche (bagnabilità, riempimento, rugosità, morbidezza e composizione chimica), chimiche (resistenza alla corrosione e presenza di gruppi funzionali in superficie), meccaniche (duttilità, resistenza alla trazione, resistenza allo snervamento, resistenza alla compressione e alla fatica) e biologiche [28].

### **3.1 Biomateriali disponibili**

Molti sono i biomateriali studiati e sviluppati negli ultimi anni, ma quelli che hanno mostrato le migliori caratteristiche sono gli hydrogel, le nanoparticelle, i biomateriali a base di carbonio e gli scaffold senza cellule.

Gli scaffold possono essere molto validi per la generazione di innovativi sistemi di coltura 3D e per applicazioni in vivo. Infatti, la capacità degli scaffold bioingegnerizzati di imitare la matrice extracellulare consente di ricreare un ambiente che favorisca l'adesione, la migrazione e la proliferazione delle cellule, guidando anche il trasporto dei nutrienti. Inoltre, la possibilità di controllare il comportamento cellulare attraverso la funzionalizzazione dei biomateriali con segnali biochimici suggerisce che gli scaffold siano ideali per essere combinati con le cellule nel campo della rigenerazione neuronale.

La medicina rigenerativa può quindi avere un ruolo fondamentale per la rigenerazione del tessuto e per bloccare la progressione delle malattie neurodegenerative. Si riportano in seguito i materiali usati per la rigenerazione e riparazione neuronale [29].

### 3.1.1 Hydrogel

Gli Hydrogel sono reti di polimeri tridimensionali, altamente idratati e insolubili in acqua. Sono detti gel fisici se i reticoli si generano attraverso legami chimici secondari o fisici come legami ad idrogeno, interazione ioniche o forze di van der Waals. Nei gel chimici, la rete è ottenuta mediante reticolazione dei polimeri attraverso legami chimici primari, in particolare legami covalenti.

L'elevato contenuto di acqua, la porosità e la consistenza morbida degli hydrogel consentono loro di trasportare ossigeno, nutrienti e fattori solubili per simulare i tessuti viventi meglio di altri biomateriali.

Nel campo della rigenerazione neurale sono stati studiati e utilizzati molti tipi di hydrogel, da soli o in miscela tra di loro con diversi rapporti. Si tratta di hydrogel naturali derivati da acido ialuronico (HA), xiloglucano, collagene, alginato di sodio e gelatina, ma anche di hydrogel sintetici a base di poliacrilammide e polietilenglicole [28].

Diversi tipi di cellule possono essere incapsulate in strutture di hydrogel 3D, che verranno poi impiantate nel tessuto cerebrale, oppure l'hydrogel stesso può essere impiantato in uno stato di pregel, che formerà poi un gel direttamente nel cervello, consentendo una localizzazione più precisa delle cellule impiantate.

Gli hydrogel, inoltre, possono essere utilizzati attraverso la somministrazione orale o polmonare, illustrata nella Figura 3.1.

Nell'Alzheimer, gli studi condotti da Chaudhuri O. et al [30] si sono concentrati principalmente sulla somministrazione di farmaci.

L'incapsulamento di fibroblasti (cellule caratteristiche del tessuto connettivo) secernenti VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), in alginato (polimero di origine naturale) ha ridotto la deposizione di A $\beta$  (beta-amiloide) in modelli murini. Inoltre, l'incapsulamento di cellule staminali neurali in diversi tipi di hydrogel ha migliorato la sopravvivenza delle cellule staminali e le capacità cognitive in modelli murini.

Per quanto riguarda il Parkinson, molti autori si sono concentrati sulla somministrazione di dopamina. Senthilkumar e coautori nel 2007 [31] e, più recentemente, Ren et al. nel 2017 [32], hanno studiato l'effetto della somministrazione di dopamina da hydrogel di destrano/gelatina e chitosano/gelatina, rispettivamente. Entrambi i tipi di hydrogel hanno mostrato un buon rilascio del farmaco e Senthilkumar et al. [33] hanno notato un miglioramento comportamentale e motorio nei topi affetti da Parkinson dopo il trattamento.

Al contrario, pochi autori hanno lavorato sull'uso dell'hydrogel nella SLA. Osaki e colleghi [34] hanno sviluppato un modello di unità motoria umana in 3D, costituita da un motoneurone e da

tutte le fibre muscolari scheletriche, in un dispositivo microfluidico di collagene/matrigel. Hanno co-coltivato sferoidi di manganese (Mn) e fasci di fibre muscolari 3D per imitare le condizioni patologiche delle unità motorie dei pazienti con SLA. Nel 2019, Fantini e colleghi [35] hanno studiato l'effetto di un idrogel composto da alginato di sodio e gelatina sulla vitalità di diversi tipi di cellule, tra cui cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC- Induced Pluripotent Stem Cell) e NSC (cellule staminali neuronali). La vitalità è stata mantenuta e l'idrogel stampato in una struttura 3D ha permesso l'organizzazione tridimensionale delle cellule, imitando l'ambiente del tessuto. Questi risultati aprono la possibilità di un nuovo modello per lo studio della SLA, soprattutto nella placca neuromuscolare [36][37].

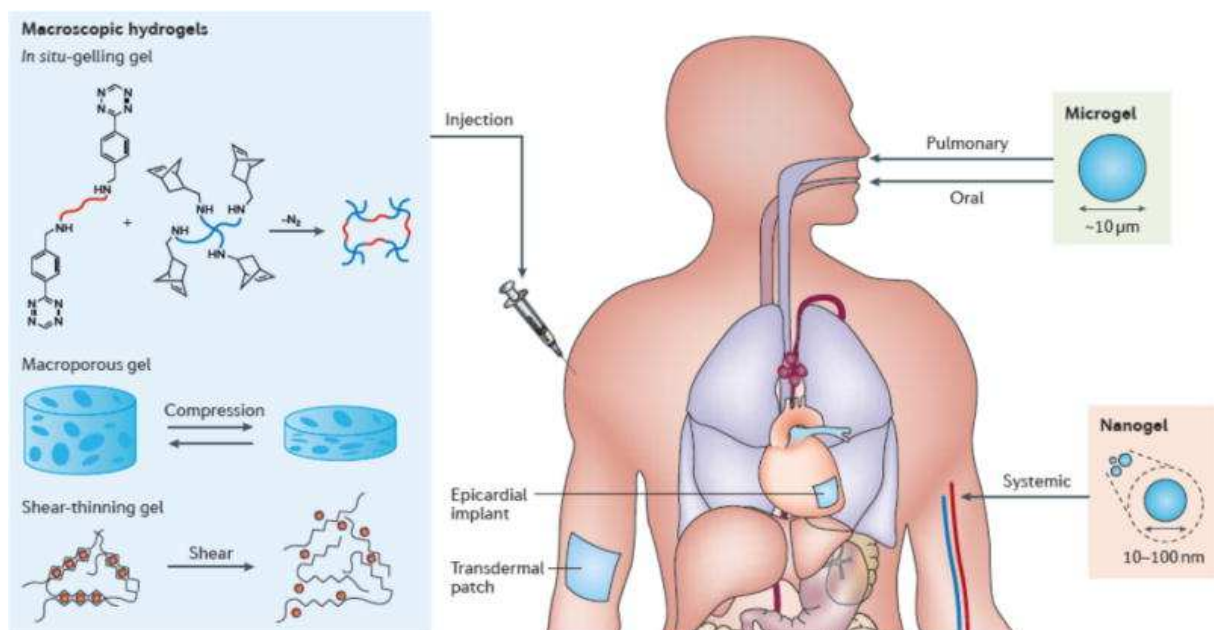


Figura 3.1: Gli hydrogel macroscopici sono utilizzati per la somministrazione transepiteliale. Gli hydrogel macroscopici iniettabili che possono essere somministrati tramite siringa-ago includono hydrogel gelificanti in situ e hydrogel macroporosi. Oltre all'iniezione transepiteliale e locale, i microgel sono adatti alla somministrazione orale, polmonare e intraossea, mentre i nanogel sono adatti alla somministrazione sistemica di farmaci.

### 3.1.2 Biomateriali a base di carbonio – grafene

Come detto nel Capitolo 2, risulta molto difficile ottenere una diagnosi precoce per le malattie neurodegenerative; per questo motivo, la terapia inizia quando la malattia è già in uno stato avanzato.

Un biomarcatore è un indicatore biologico, il cui valore può essere misurato e, in alcuni casi, può indicare la presenza di una malattia. I biomarcatori sono uno dei metodi più affidabili per diagnosticare le malattie e identificarne le fasi iniziali.

I biosensori consentono di rilevare in modo preciso le basse concentrazioni di biomarcatori nei fluidi corporei. Ad esempio, nel morbo di Parkinson, il neurotrasmettitore dopamina (DA) si esaurisce a causa della progressiva perdita dei neuroni. Pertanto, la misurazione di DA è estremamente utile come strumento diagnostico per individuare le fasi iniziali della malattia.

I materiali a base di grafene, specialmente i suoi derivati, sono risultati una buona scelta per le applicazioni di biorilevamento (biosensing).

Il grafene è un materiale costituito da un foglio 2D di atomi di carbonio, avente lo spessore equivalente alle dimensioni di un solo atomo. Gli atomi di carbonio sono ibridati  $sp^2$  e risultano strettamente impaccati in anelli di sei che formano un reticolo a nido d'ape, illustrato nella Figura 3.2. Ogni atomo di carbonio ha tre legami  $\sigma$  nel piano, responsabili della perfetta natura planare del grafene, ed un legame  $\pi$  perpendicolare al piano che può interagire con gli atomi vicini. Questa struttura ha dotato il grafene di straordinarie proprietà meccaniche, elettriche, termiche e ottiche, molte delle quali superano quelle di qualsiasi altro materiale. Queste proprietà sono estremamente vantaggiose affinché il sensore possa funzionare nel modo corretto.

A questo proposito, Butler et al. [38] hanno sviluppato un sensore elettrochimico a base di grafene. Questo sensore a base di grafene si è dimostrato altamente sensibile alla rivelazione di DA, grazie alla eccellente conduttività elettrica del materiale e l'interazione  $\pi$ - $\pi$  tra gli anelli aromatici di DA ed il grafene [39] [40].

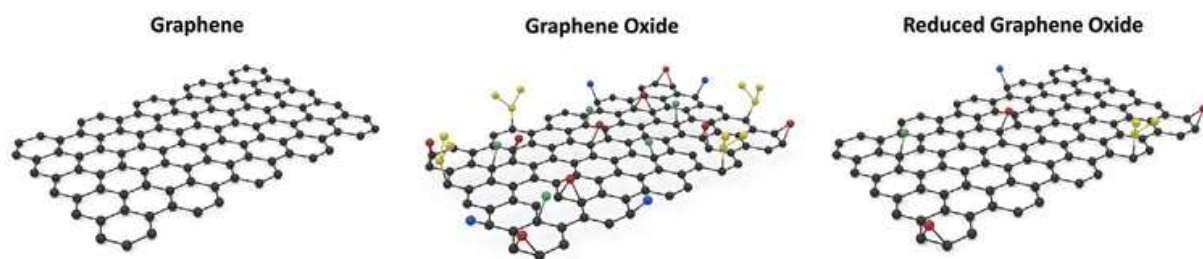


Figura 3.2: Struttura del grafene nella forma originale, ossidata e ridotta

### 3.1.3 Biomateriali polimerici

La matrice extracellulare svolge numerose funzioni e facilita la comunicazione reciproca tra le cellule. Alcuni biomateriali polimerici replicano le macromolecole con cui le cellule interagiscono in vivo. In seguito, verranno riportati i biomateriali polimerici utilizzati per la riparazione neuronale.

### *3.1.3.1 Collagene*

Il collagene ha suscitato particolare interesse per la riparazione del sistema nervoso centrale, poiché è altamente biocompatibile, biodegradabile e non tossico. In virtù delle sue caratteristiche, il collagene ha conosciuto applicazioni molto diverse nella medicina e nella scienza, come la ricostruzione di ossa e cartilagine, la medicazione di ferite, applicazioni di ingegneria tissutale, rilascio di farmaci e sistemi di incapsulamento cellulare. Può essere trasformato in varie forme a seconda dello scopo: pellicole, gel o nanoparticelle.

Il collagene è presente in tutti i mammiferi, sia nei compartimenti intracellulari che extracellulari. Attualmente sono presenti 29 diversi tipi di collagene, tuttavia il collagene di tipo I è il più abbondante e ampiamente utilizzato.

I Collagen Scaffolds (CollScaff) sono matrici di collagene e vengono generate con estrema facilità grazie all'utilizzo di diversi reticolanti chimici. I Collscaff vengono caricati con sostanze terapeuticamente attive, le quali vengono rilasciate insieme alla degradazione del collagene.

Queste strutture possono essere trasformate in base alle proprietà desiderate: risposta alle variazioni di temperatura e pH (thermoresponsivity, pH-responsivity) e alla velocità di rilascio del farmaco, che può essere aumentata o diminuita.

La biodisponibilità dei farmaci è notevolmente limitata, in quanto è presente la barriera emato-encefalica che ne ostacola il passaggio e molte molecole si degradano prima di raggiungere il cervello. Questi limiti vengono superati con successo dagli CollScaff in quanto possono essere iniettati direttamente nel sito d'interesse, evitando la somministrazione sistemica. Questo procedimento viene illustrato nella Figura 3.2.

I CollScaff possono essere utilizzati come sistema di rilascio in grado di incapsulare le cellule staminali o agire come fonti localizzate di fattori di crescita per promuovere la capacità di riparazione del sistema nervoso centrale. L'incapsulamento delle cellule fornisce stabilità alle cellule trapiantate e ne migliora la sopravvivenza all'interno del tessuto [41].



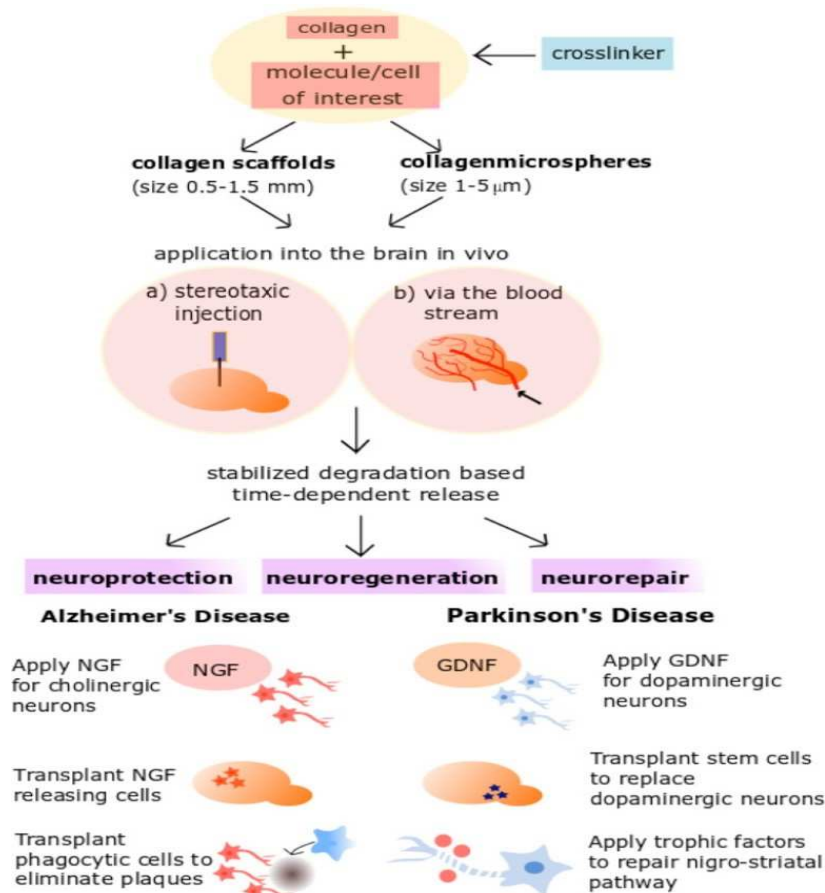


Figura 3.2: Strategie terapeutiche per applicare gli scaffolds di collagene nei pazienti affetti da Alzheimer e Parkinson.

### 3.1.3.2 Acido ialuronico

Nell'ultimo decennio, l'acido ialuronico (HA) ha suscitato un interesse crescente nel campo dell'ingegneria biomedica in quanto molecola biocompatibile, biodegradabile e versatile. Infatti, l'HA è uno dei principali componenti della matrice extracellulare (ECM) ed è essenziale per il mantenimento dell'omeostasi cellulare.

Le malattie del SNC causano danni irreversibili con maggiori difficoltà di guarigione, rigenerazione e ripristino delle funzioni fisiologiche, a causa della risposta infiammatoria di astrociti, microglia e altre cellule gliali. L'ictus, i disturbi neurologici, le lesioni cerebrali traumatiche, le lesioni del midollo spinale e le malattie demielinizzanti possono causare danni estesi con perdita permanente delle capacità motorie e deterioramento cognitivo. Le prime fasi del danno al tessuto nervoso sono associate alla morte cellulare nell'area interessata ed al danno ai vasi sanguigni.

Attualmente, l'acido ialuronico si è dimostrato un ottimo candidato per la realizzazione di sistemi 3D in grado di promuovere la rigenerazione dei tessuti, svolgendo un ruolo importante nel sistema nervoso centrale, ad esempio nella migrazione, nella proliferazione, nella

differenziazione e in altre funzioni cellulari. Infatti, il recettore CD44, presente sulla superficie gliale e sulle cellule neuronali, lega le molecole di HA influenzando il comportamento delle cellule neuronali sia in condizioni fisiologiche che patologiche. Ad esempio, Ballios e collaboratori [42] hanno sviluppato una miscela iniettabile, biodegradabile e sensibile alla luce di acido ialuronico e metilcellulosa (HAMC). L'HAMC ha mostrato un aumento della sopravvivenza cellulare (grazie alla presenza di HA) e della distribuzione delle cellule (grazie alla presenza di MC). Il meccanismo pro-sopravvivenza di HAMC è stato attribuito all'interazione del recettore CD44 con l'acido ialuronico.

Nelle malattie demielinizzanti, non sono ancora disponibili protocolli sperimentali in grado di fornire soluzioni di rimielinizzazione [43].

### *3.1.3.3 Chitina e chitosano*

Chitina e chitosano sono dei polisaccaridi e sono ampiamente presenti in natura. Questi materiali si sono rivelati entrambi adatti per promuovere l'adesione delle cellule nervose. La chitina è stata proposta come biomateriale per il trattamento neuronale. Per esempio, è stata utilizzata con nanotubi di carbonio come scaffold per la crescita neuronale. La chitina, sotto forma di tubo, è stata efficacemente utilizzata come ponte per gli innesti di nervo surale (nervo sensoriale presente nella regione del polpaccio) in un modello di difetto del nervo sciatico nel ratto.

È interessante notare che la chitina non è stata proposta solo come potenziale terapia, ma anche come marcatore molecolare per le malattie neurologiche. Nella malattia di Alzheimer, la chitina è elevata e accumulata nel cervello e facilita la formazione delle placche di A $\beta$ .

A differenza della chitina, il chitosano e l'oligosaccaride di chitosano sono stati ampiamente studiati per i loro effetti benefici sulle malattie neurologiche, in particolare sul morbo di Alzheimer. È noto che l'inibizione dell'acetilcolinesterasi sia il bersaglio della terapia della malattia di Alzheimer. L'oligosaccaride chitosano con deacetilazione al 90% e basso peso molecolare (da 1 a 5 kDa) ha inibito l'espressione proteica dell'acetilcolinesterasi [44].

### *3.1.4 Nanoparticelle per la somministrazione di farmaci al cervello*

Il campo delle nanotecnologie è progredito in modo esponenziale nell'ultimo decennio e molti prodotti contenenti nanoparticelle sono oggi utilizzati in varie applicazioni.

Le nanoparticelle (NP) sono definite come particelle con una dimensione compresa tra 1 e 100 nm. Presentano proprietà diverse a seconda delle loro dimensioni e delle funzionalità di superficie. La dimensione, per esempio, influenza l'assorbimento della luce. Grazie a questa

proprietà possono essere usate come sonde ottiche, andandosi a legare a molecole che interagiscono con specifiche proteine.

Un'altra importante caratteristica è il rapporto superficie/volume: a parità di unità di volume ci sono più atomi in superficie che partecipano alle reazioni del nanomateriale.

Le NP sono utilizzate come vettori di farmaci con applicazioni sia nella diagnostica che nella terapia.

Queste NP, tra cui NP polimeriche, nanoemulsioni, liposomi e NP solide, sono considerate potenziali applicazioni cliniche. La loro applicabilità clinica dipende da diversi parametri, come le proprietà fisiche e chimiche, l'efficienza di caricamento del farmaco, il rilascio del farmaco e, soprattutto, la bassa o nulla tossicità del vettore stesso. Infatti, le NP possono essere tossiche e possiedono la capacità di accumularsi nelle cellule e di indurre una tossicità organo-specifica. Un altro fattore limitante per l'uso sistemico delle NP è costituito dalla loro rapida eliminazione dalla circolazione sanguigna da parte del sistema reticolo-endoteliale (RES) [45][46].

#### *3.1.4.1 Nanoparticelle lipidiche solide*

Per molti anni, i materiali lipidici solidi a temperatura ambiente sono stati utilizzati nell'industria farmaceutica per la preparazione di emulsioni ed unguenti in ragione dell'elevata affinità per questo tipo di materiali dello spazio intercellulare ricco di lipidi.

Negli anni '90 Muller et al. [47] proposero le nanoparticelle lipidiche solide (SLN), nonché trasportatori lipidici nanostrutturati (NLC). Infatti, combinare le caratteristiche vantaggiose delle nanoparticelle con quelle dei componenti lipidici non tossici e biodegradabili sembrava un'ottima idea. Queste NP lipidiche sono state promosse come un'opzione più sicura rispetto ad altri nanosistemi; sono costituite da una matrice solida che consentirebbe il rilascio controllato del farmaco, essendo però più stabili (e sicuramente più economiche) rispetto ai liposomi a base di fosfolipidi.

Il trasporto di sostanze attraverso la BEE può avvenire mediante quattro meccanismi principali: diffusione paracellulare, diffusione transcellulare, diffusione facilitata dai trasportatori e trasporto attivo.

Sebbene gli studi condotti da Yu et al. nel 2013 [48] e da Zhang et al. nel 2014 [49] abbiano suggerito che le NP possano entrare nel SNC attraverso la via paracellulare (ossia attraverso l'apertura transitoria delle giunzioni strette, come nel caso delle NP rivestite di chitosano), ci sono ora prove che suggeriscono che il meccanismo predominante è l'endocitosi delle NP. Una volta all'interno della cellula endoteliale, le NP possono essere esocitate dall'altra parte della

cellula attraverso il citoplasma della cellula stessa (transitosi delle NP) o rilasciate nello spazio intracellulare, oltrepassando così la BEE e favorendo il loro accesso al SNC.

Poiché l'endocitosi delle NP da parte delle cellule endoteliali della BEE sembra essere mediata prevalentemente da recettori, attraverso gli studi condotti da Ceña e Játiva nel 2018 [50] e Kuo, Wang et al. nel 2019 [51][52] sono stati compiuti molti sforzi per la funzionalizzazione della superficie delle SLN al fine migliorare la loro disponibilità nel SNC [53].

Nel corso degli anni sono stati presentati alcuni studi per il trattamento del PD, alcuni dei quali prevedevano l'uso di vari farmaci incapsulati in SLN e NLC, tra cui l'apomorfina (APO), un farmaco agonista del recettore della dopamina. In uno degli studi, condotti da Hsu S-H, Wen C-J, Al-Suwayeh SA, Chang H-W, Yen T-C, Fang J-Y [54], l'APO è stato incapsulato in tre diverse formulazioni: SLN, NLC ed emulsioni lipidiche (LE), ed è stato condotto uno studio comparativo di queste formulazioni. A seconda del tipo di nanostruttura, delle dimensioni e della carica superficiale, l'efficienza di incapsulamento e il profilo di rilascio sono risultati diversi: le LE hanno dato i migliori risultati per quanto riguarda il rilascio prolungato. D'altra parte, esperimenti condotti di bioluminescenza in tempo reale in vivo sul cervello di ratti maschi, utilizzando la sulforodamina B (SRB), hanno dimostrato che i NLC potevano accumularsi in regioni cerebrali selezionate rispetto alle altre due formulazioni.

Un altro studio, pubblicato da Tsai M-J, Huang Y-B, Wu P-C, Fu Y-S, Kao Y-R [55] con lo stesso farmaco, è stato condotto per valutare la fattibilità della somministrazione orale di apomorfina mediante SLN. Questo studio ha dimostrato che le variazioni degli emulsionanti modificano le proprietà fisico-chimiche delle SLN, che possono influenzare le loro prestazioni in vivo. Gli esperimenti in vivo hanno dimostrato che le SLN hanno migliorato la biodisponibilità dell'APO e sono state in grado di veicolare il farmaco nello striato cerebrale, suggerendo il potenziale uso delle SLN come sistema di somministrazione dell'APO per via orale [56].

#### *3.1.4.2 Nanoparticelle inorganiche*

Le nanoparticelle inorganiche sono atossiche e biocompatibili, idrofiliche ed altamente stabili. Includono principalmente vari metalli, materiali semiconduttori e NP di ossidi metallici; sono state ampiamente studiate come farmaci, grazie alle loro dimensioni controllabili e alle proprietà ottiche uniche, alla conducibilità elettrica, alle proprietà magnetiche, alle proprietà catalitiche e alla buona biocompatibilità. In generale, i sistemi basati su nanoparticelle inorganiche includono nanoparticelle inorganiche a base d'oro, di ferro, di ossido di cerio, di molibdeno e di silice [57].

#### *3.1.4.2.1 Nanoparticelle d'oro*

Le nanoparticelle d'oro (GNP) rappresentano uno dei nanomateriali metallici più studiati, per il loro possibile utilizzo come vettori di trasporto e agenti diagnostici e terapeutici. Le GNP hanno generalmente una buona biocompatibilità e una bassa tossicità, e la loro ampia superficie è adatta alla funzionalizzazione con biomolecole tramite adsorbimento fisico o con gruppi reattivi (ad esempio, gruppi amminici, tiolici e carbossilici) tramite legame ionico o covalente. Inoltre, possono essere fabbricate in varie forme con dimensioni ridotte e personalizzabili, da 1 a 100 nm, che possono essere utili per superare la BEE. Grazie alla risonanza plasmonica di superficie localizzata, ossia un processo fisico che si osserva quando la luce polarizzata colpisce un film metallico in condizioni di riflessione totale, le GNP interagiscono con la luce e presentano proprietà ottiche significative, che le distinguono da altri nanomateriali. Questa proprietà le rende utili per l'imaging, per i sensori e la terapia fototermica.

Data la straordinaria accessibilità della pelle, le GNP sono di grande interesse per lo sviluppo di sistemi multifunzionali per la somministrazione di farmaci a livello cutaneo [58].

Sivaji e Kannan nel 2019 [59] svilupparono nanoparticelle d'oro coniugate con donepezil (AuPD), un inibitore dell'acetilcolinesterasi, e funzionalizzate con polisorbato 80 e polietilenglicole. Attraverso test in vivo condotti nel cervello di un pesce, si è notato un aumento dal 30 al 38% dell'attività del farmaco. Inoltre, esaminando sezioni istologiche del cervello dell'animale, il trattamento con GNP non ha innescato una risposta infiammatoria, in quanto il polisorbato 80 e il tensioattivo facilitano l'attraversamento della BEE. Gli autori hanno concluso che le GNP sono molto valide per la loro biocompatibilità ed la loro potenziale capacità di attraversamento della BEE [60].

#### *3.1.4.2.2 Nanoparticelle di ferro*

Le nanoparticelle a base di ferro risultano molto reattive a causa della loro ampia area superficiale. Si ossidano per formare ioni in presenza di ossigeno e di acqua.

Tra i diversi tipi di NPs, le nanoparticelle magnetiche di ossido di ferro (IONPs) sono di particolare interesse per il loro utilizzo in varie applicazioni biomediche e neurobiologiche. Ad esempio, le IONP sono utilizzate come agenti di contrasto nella risonanza magnetica (MRI), per il tracciamento cellulare basato sulla MRI di cellule caricate con IONP, per il targeting di farmaci diretto ai tumori attraverso la barriera emato-encefalica e per il trattamento diretto antitumorale.

In generale, la distribuzione del farmaco in tutto il cervello può diminuire la quantità di farmaco che raggiunge il bersaglio, riducendo così l'efficacia della terapia. Pertanto, è necessario sviluppare un sistema di somministrazione che garantisca che il farmaco raggiunga il sito esatto della lesione. Gli studi condotti da Brambilla et al nel 2011 [61] sono stati indirizzati verso lo sviluppo di molecole ad alta affinità per l'A $\beta$  (peptide beta-amiloide), in grado di ridurre il livello di A $\beta$  nel cervello.

È stato riportato da Yoshiyama et al nel 2007 [62] che un'importante attivazione microgliale precede la formazione di grovigli e l'eliminazione dell'attivazione microgliale indotta dal A $\beta$  potrebbe ritardare la progressione delle malattie neurodegenerative.

Adams et al. nel 2007 [63] hanno coniugato il peptide  $\gamma$ 377-395 della fibrina (un peptide derivato dalla fibrina in grado di inibire l'attività microgliale in vivo in modo specifico) a nanoparticelle di ossido di ferro ( $\gamma$ -Fe $_2$ O $_3$ ) (con diametro di  $21 \pm 3,5$  nm) per contrastare la breve emivita del peptide. Lo studio ha dimostrato che, rispetto al peptide libero della stessa concentrazione, le nanoparticelle di  $\gamma$ -Fe $_2$ O $_3$  sono in grado di inibire in modo specifico le cellule microgliali nei topi, a riprova del fatto che le nanoparticelle possono essere utilizzate per la somministrazione di sostanze al cervello e per fornire una possibile strategia terapeutica. Tuttavia, gli IONP possono avere effetti tossici su cellule e tessuti, causati almeno in parte dalla formazione ferro-mediata di radicali e dallo stress ossidativo. La potenziale tossicità degli IONP è particolarmente importante per quanto riguarda l'uso degli IONP per applicazioni neurobiologiche, poiché le alterazioni dell'omeostasi cerebrale del ferro sono fortemente collegate alle malattie neurodegenerative umane [64][65].

#### *3.1.4.2.3 Nanoparticelle di ossido di cerio*

Le nanoparticelle di ossido di cerio (CeONPs) sono ampiamente utilizzate nell'industria dei materiali come agenti lucidanti per il vetro, additivi per carburanti per migliorare la combustione ed assorbitori di raggi ultravioletti. La loro utilità in queste applicazioni deriva dalle loro funzioni antiossidanti. Tuttavia, oltre alle applicazioni sui materiali, le CeONPs mostrano promettenti applicazioni nel trattamento di malattie associate allo stress ossidativo, in particolare quelle associate alla neurodegenerazione.

Il cerio è il secondo elemento della serie dei lantanidi. L'atomo di cerio può esistere in due stati di valenza, +3 o +4 (che non si ossida in acqua) e si alterna tra i due nelle reazioni di ossido-riduzione. Nella forma di nanoparticelle, il cerio è legato all'ossigeno in una struttura reticolare cristallina che presenta alcune lacune elettroniche.

Sulla base dei cambiamenti di stato di ossidazione, le CeONPs interagiscono con numerosi radicali liberi, contrastando ed inibendo la loro attività tossica.

Grazie ai loro potenti effetti antiossidanti e rigenerativi, le CeONPs hanno prolungato la durata di vita dei neuroni corticali e spinali in coltura, diminuito la disfunzione cellulare associata a fattori di stress ossidativi, incrementato la trascrizione di geni associati alla neuroprotezione e aumentato la secrezione di dopamina.

Rispetto ad altri farmaci, come la n-acetilcisteina, le vitamine E e C e la melatonina, le CeONPs hanno fornito una protezione superiore in termini di sopravvivenza neuronale e di mantenimento della normale segnalazione del calcio in risposta allo stress ossidativo. Gli studi condotti da Singh N, Cohen CA, Rzigalinski BA [66] hanno preparato il terreno per l'avvio di studi in vivo.

Sia l'AD che il PD sono associati ad alti livelli di stress ossidativo, il che li rende un bersaglio per il trattamento con le CeONPs. Il segno distintivo dell'AD è la morte iniziale dei neuroni colinergici corticali, mentre nel PD il segno distintivo è la morte dei neuroni dopaminergici nigrostriatali. Finora non sono stati condotti studi in vivo con le CeONPs in modelli animali di AD, ma diversi studi in vitro mostrano un ottimo potenziale e saranno menzionati in questa sede. In questi studi condotti da Singh N, Cohen CA, Rzigalinski BA [67], l'aggregazione di A $\beta$ 1-42 ha indotto una rapida morte di colture di neuroni corticali puri di ratto, che è stata bloccata dalle CeONPs, suggerendo fortemente l'utilità delle CeONPs nei modelli animali di AD. Successivamente, Dowding et al. [68] hanno mostrato risultati simili per le CeONPs da 3-5 nm e hanno dimostrato che anch'esse bloccano la disfunzione mitocondriale prodotta dall'A $\beta$ 1-42. Saranno necessarie ulteriori sperimentazioni per determinare eventuali effetti benefici nei modelli animali di AD.

Il PD è anche associato ad alti livelli di stress ossidativo, che causa la morte dei neuroni della substantia nigra e dello striato. Utilizzando un modello di insetto con sintomi riconducibili al Parkinson ed esponendolo ad agenti ossidanti, lo studio condotto da Rzigalinski BA, Meehan K, Whiting MD [69] ha dimostrato che il pre-trattamento dell'animale con CeONPs ha migliorato la sopravvivenza e preservato la funzione motoria. Gli stessi autori hanno anche condotto studi utilizzando il modello murino di PD con MPTP (sostanza neurotossica in grado di causare sintomi analoghi alla malattia di Parkinson). Per questi studi sono state utilizzate le stesse CeONPs descritte in precedenza, ma le particelle sono state disciolte in tampone salino-citrato per la somministrazione. Negli studi iniziali, i topi sono stati pretrattati con 0,05-50 mg/kg di CeONPs in soluzione salina citrata tramite iniezione endovenosa. E' stato scoperto che le CeONPs bloccano in modo significativo il declino della dopamina striatale indotto

dall'MPTP e preservano i neuroni dopaminergici nella substantia nigra. La Figura 3.3 mostra un risultato rappresentativo della conservazione dei neuroni dopaminergici nella substantia nigra. Questi risultati suggeriscono che le CeONPs potrebbero essere una terapia futura per la malattia PD [70].

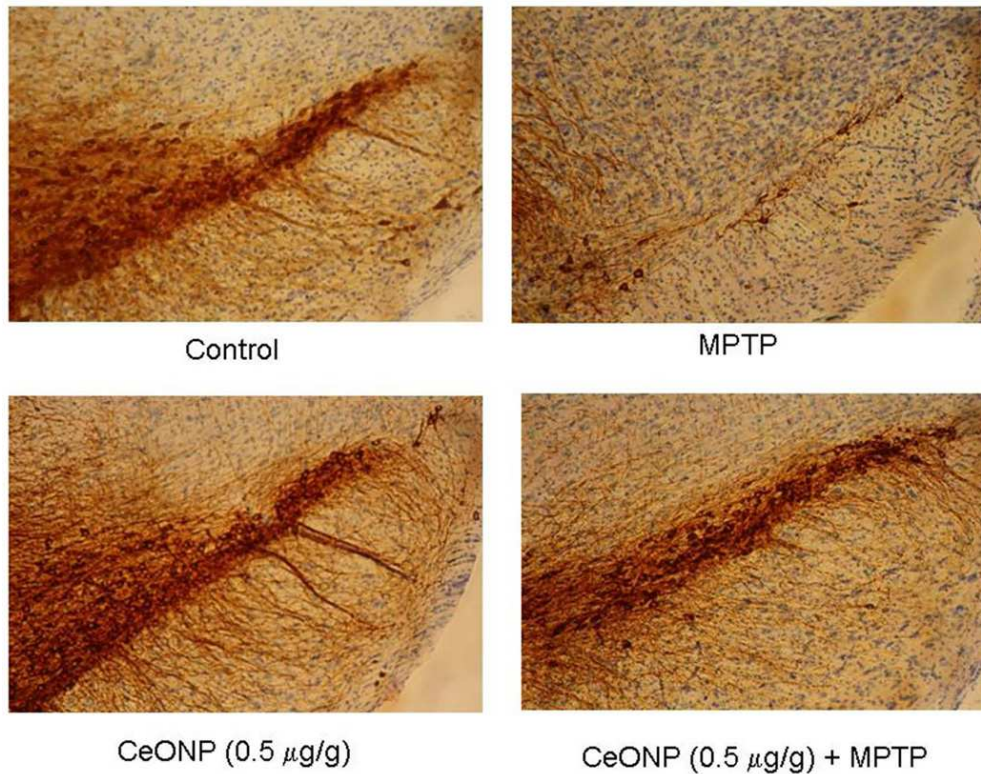


Figura 3.3: Nelle immagini superiori vengono rappresentati i neuroni dopaminergici senza il trattamento con CEONPs. Nell'immagine sulla dx, dopo il trattamento con MPTP, i neuroni dopaminergici vengono danneggiati in modo consistente. Nelle immagini inferiori, i neuroni dopaminergici vengono trattati con CEONPs e, dopo l'inserimento del MPTP, l'integrità dei neuroni viene preservata quasi totalmente

#### 3.1.4.2.4 Nanoparticelle di solfuro di molibdeno

Le nanoparticelle di solfuro di molibdeno (NPMoS<sub>2</sub>) sono utilizzate come rivestimenti autolubrificanti e additivi ai lubrificanti liquidi. Recentemente, le potenziali applicazioni mediche delle NPMoS<sub>2</sub> hanno attirato sempre maggiore interesse, come i rivestimenti per giunti artificiali o fili ortodontici.

Zhang et al. [71] hanno riferito che le NPMoS<sub>2</sub> rivestite con la cisteina possono contribuire all'eliminazione dei radicali liberi accumulati ed alla riparazione dei danni che questi ultimi hanno provocato. Inoltre le NP MoS<sub>2</sub> non hanno mostrato alcun effetto tossico apparente in vitro, anche a concentrazioni elevate fino a 100 µg/mL [72].



#### 3.1.4.2.5 *Nanoparticelle di silice*

Il biossido di silicio ( $\text{SiO}_2$ ), comunemente chiamato silice, è il composto più abbondante sulla Terra. Essendo un materiale inorganico, le nanoparticelle di silice (SiNPs) possiedono dimensioni dei pori uniformi, ampia area superficiale e superfici facilmente modificabili grazie alla presenza di gruppi silanolicci (Si-OH).

Le nanoparticelle di silice non porose, un tipo di nanoparticelle di silice amorfe, hanno un'eccellente biocompatibilità e sono ampiamente utilizzate nella somministrazione di farmaci, nell'imaging, nell'incapsulamento enzimatico, nella terapia (come agenti stabilizzanti) e in altre applicazioni.

Il tessuto cerebrale è costituito principalmente da neuroni e cellule gliali. Le piccole dimensioni delle nanoparticelle di silice combinate con le proteine permettono di oltrepassare la barriera emato-encefalica passiva e raggiungere il sistema nervoso centrale attraverso l'epitelio nasale. Gli studi condotti da Mr Yang et al. [73] hanno riferito che purtroppo le SiNPs potenziano l'accumulo di  $\text{A}\beta$ , caratteristica patologica della malattia di Alzheimer (AD), nelle cellule di un topo. Ciò dimostra che non tutte le nanoparticelle hanno un effetto terapeutico per le malattie neurodegenerative [74].

## Conclusioni

Le malattie neurodegenerative risultano difficilmente curabili, in quanto attualmente non esistono terapie che siano in grado di arrestare la progressiva ed irreversibile perdita di neuroni. Diagnosticare questo tipo di patologie risulta molto complicato e le terapie iniziano quando il processo di degenerazione neuronale è già in uno stato avanzato. Inoltre, la presenza della barriera emato-encefalica ostacola significativamente la somministrazione dei farmaci, che non riescono ad oltrepassarla ed a raggiungere il cervello nelle dosi efficaci. Alcuni biomateriali potrebbero rappresentare una soluzione per queste problematiche.

Per quanto concerne le malattie neurodegenerative, i biomateriali si sono dimostrati molto validi nelle seguenti funzioni: riparazione e rigenerazione neuronale, diagnosi e somministrazione dei farmaci.

I biomateriali polimerici come il collagene, l'acido ialuronico, chitina e chitosano risultano ottimali per la riparazione e la rigenerazione neuronale. In particolare, gli hydrogel vengono utilizzati per creare strutture 3D, in grado di incapsulare diversi tipi di cellule che vengono poi impiantate nel tessuto cerebrale. Con il collagene, si possono creare delle impalcature, chiamate CollScaff, che possono essere utilizzate come sistema di rilascio in grado di incapsulare le cellule staminali o agire come fonti localizzate di fattori di crescita per promuovere la capacità di riparazione del sistema nervoso centrale. I biomateriali a base di grafene si sono rivelati utili nella diagnosi, in particolare nella costruzione di sensori altamente sensibili grazie alle proprietà elettriche di questo materiale. Infine, le nanoparticelle si sono dimostrate adatte nella somministrazione dei farmaci grazie alle loro dimensioni e alle loro eccellenti proprietà fisiche e chimiche.

Nonostante molti biomateriali siano stati testati in vivo su modelli animali, è necessario condurre ancora molti studi prima di applicare questi biomateriali nella riparazione neuronale sull'uomo; infatti, alcuni tra questi, come le nanoparticelle di silice, hanno mostrato effetti avversi come stress ossidativo o infiammazioni.

Alcuni biomateriali possiedono importanti potenzialità per curare le malattie neurodegenerative e rappresentano una fonte di speranza per queste patologie attualmente incurabili.

## Bibliografia

- [1] Dugger, B. N., & Dickson, D. W. (2017). Pathology of neurodegenerative diseases. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 9(7), a028035.
- [2] Agnello, L., & Ciaccio, M. (2022). Neurodegenerative Diseases: From Molecular Basis to Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(21), 12854.
- [3] Williams, A. (2002). Defining neurodegenerative diseases: Disorders will be named after responsible rogue proteins and their solutions. *Bmj*, 324(7352), 1465-1466.
- [4] Neri, S., Mastroianni, G., Gardella, E., Aguglia, U., & Rubboli, G. (2022). Epilepsy in neurodegenerative diseases. *Epileptic Disorders*, 24(2), 249-273.
- [5] Park, S. J., Li, C., & Chen, Y. M. (2021). Endoplasmic reticulum calcium homeostasis in kidney disease: pathogenesis and therapeutic targets. *The American Journal of Pathology*, 191(2), 256-265.
- [6] Madreiter-Sokolowski, C. T., Thomas, C., & Ristow, M. (2020). Interrelation between ROS and Ca<sup>2+</sup> in aging and age-related diseases. *Redox biology*, 36, 101678.
- [7] Khanam, H., Ali, A., & Asif, M. (2016). Neurodegenerative diseases linked to misfolded proteins and their therapeutic approaches: A review. *European journal of medicinal chemistry*, 124, 1121-1141.
- [8] Wegmann, S., Eftekharzadeh, B., Tepper, K., Zoltowska, K. M., Bennett, R. E., Dujardin, S., ... & Hyman, B. T. (2018). Tau protein liquid–liquid phase separation can initiate tau aggregation. *The EMBO journal*, 37(7), e98049.
- [9] Zbinden, A., Pérez-Berlanga, M., De Rossi, P., & Polymenidou, M. (2020). Phase separation and neurodegenerative diseases: a disturbance in the force. *Developmental cell*, 55(1), 45-68.
- [10] Sumien, N., Cunningham, J. T., Davis, D. L., Engelland, R., Fadeyibi, O., Farmer, G. E., ... & Cunningham, R. L. (2021). Neurodegenerative disease: roles for sex, hormones, and oxidative stress. *Endocrinology*, 162(11), bqab185.
- [11] Golpich, M., Amini, E., Mohamed, Z., Azman Ali, R., Mohamed Ibrahim, N., & Ahmadiani, A. (2017). Mitochondrial dysfunction and biogenesis in neurodegenerative diseases: pathogenesis and treatment. *CNS neuroscience & therapeutics*, 23(1), 5-22.
- [12] Teleanu, D. M., Niculescu, A. G., Lungu, I. I., Radu, C. I., Vladâcenco, O., Roza, E., ... & Teleanu, R. I. (2022). An overview of oxidative stress, neuroinflammation, and neurodegenerative diseases. *International journal of molecular sciences*, 23(11), 5938.
- [13] Radhakrishnan, D. M., & Goyal, V. (2018). Parkinson's disease: A review. *Neurology India*, 66(7), 26.

- [14] Lane, C. A., Hardy, J., & Schott, J. M. (2018). Alzheimer's disease. *European journal of neurology*, 25(1), 59-70.
- [15] Hulisz, D. (2018). Disease state overview. *Am J Manag Care*, 24(15), S320-S326.
- [16] Sivandzade, F., & Cucullo, L. (2021). Regenerative stem cell therapy for neurodegenerative diseases: an overview. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 2153.
- [17] Daneman, R., & Prat, A. (2015). The blood–brain barrier. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7(1), a020412.
- [18] Abbott, N. J., Patabendige, A. A., Dolman, D. E., Yusof, S. R., & Begley, D. J. (2010). Structure and function of the blood–brain barrier. *Neurobiology of disease*, 37(1), 13-25.
- [19] Obermeier, B., Daneman, R., & Ransohoff, R. M. (2013). Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nature medicine*, 19(12), 1584-1596.
- [20] Liébana-Vilches, A. B. (2022). Interacción de consecuencias motoras y no motoras en la enfermedad de Parkinson y hemiparkinson experimental.
- [21] Mele, B., Van, S., Holroyd-Leduc, J., Ismail, Z., Pringsheim, T., & Goodarzi, Z. (2020). Diagnosis, treatment and management of apathy in Parkinson's disease: a scoping review. *BMJ open*, 10(9), e037632.
- [22] Tolosa, E., Wenning, G., & Poewe, W. (2006). The diagnosis of Parkinson's disease. *The Lancet Neurology*, 5(1), 75-86.
- [23] Weller, J., & Budson, A. (2018). Current understanding of Alzheimer's disease diagnosis and treatment. *F1000Research*, 7.
- [24] Ozben, T., & Ozben, S. (2019). Neuro-inflammation and anti-inflammatory treatment options for Alzheimer's disease. *Clinical biochemistry*, 72, 87-89.
- [25] Quinn, C., & Elman, L. (2020). Amyotrophic lateral sclerosis and other motor neuron diseases. *CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology*, 26(5), 1323-1347.
- [26] Corcia, P., Beltran, S., Bakkouche, S. E., & Couratier, P. (2021). Therapeutic news in ALS. *Revue Neurologique*, 177(5), 544-549.
- [27] Feldman, E. L., Goutman, S. A., Petri, S., Mazzini, L., Savelieff, M. G., Shaw, P. J., & Sobue, G. (2022). Amyotrophic lateral sclerosis. *The Lancet*, 400(10360), 1363-1380.
- [28] Bordoni, M., Scarian, E., Rey, F., Gagliardi, S., Carelli, S., Pansarasa, O., & Cereda, C. (2020). Biomaterials in neurodegenerative disorders: A promising therapeutic approach. *International journal of molecular sciences*, 21(9), 3243.
- [29] Keane, T. J., & Badylak, S. F. (2014, June). Biomaterials for tissue engineering applications. In *Seminars in pediatric surgery* (Vol. 23, No. 3, pp. 112-118). WB Saunders.

- [30] Spuch, C., Antequera, D., Portero, A., Orive, G., Hernández, R. M., Molina, J. A., ... & Carro, E. (2010). The effect of encapsulated VEGF-secreting cells on brain amyloid load and behavioral impairment in a mouse model of Alzheimer's disease. *Biomaterials*, *31*(21), 5608-5618.
- [31] Senthilkumar, K. S., Saravanan, K. S., Chandra, G., Sindhu, K. M., Jayakrishnan, A., & Mohanakumar, K. P. (2007). Unilateral implantation of dopamine-loaded biodegradable hydrogel in the striatum attenuates motor abnormalities in the 6-hydroxydopamine model of hemi-parkinsonism. *Behavioural brain research*, *184*(1), 11-18.
- [32] Ren, Y., Zhao, X., Liang, X., Ma, P. X., & Guo, B. (2017). Injectable hydrogel based on quaternized chitosan, gelatin and dopamine as localized drug delivery system to treat Parkinson's disease. *International journal of biological macromolecules*, *105*, 1079-1087.
- [33] Ucar, B., & Humpel, C. (2019). Therapeutic efficacy of glial cell-derived neurotrophic factor loaded collagen scaffolds in ex vivo organotypic brain slice Parkinson's disease models. *Brain research bulletin*, *149*, 86-95.
- [34] Osaki, T., Uzel, S. G., & Kamm, R. D. (2018). Microphysiological 3D model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) from human iPS-derived muscle cells and optogenetic motor neurons. *Science advances*, *4*(10), eaat5847.
- [35] Fantini, V., Bordoni, M., Scocozza, F., Conti, M., Scarian, E., Carelli, S., ... & Cereda, C. (2019). Bioink composition and printing parameters for 3D modeling neural tissue. *Cells*, *8*(8), 830.
- [36] Cao, H., Duan, L., Zhang, Y., Cao, J., & Zhang, K. (2021). Current hydrogel advances in physicochemical and biological response-driven biomedical application diversity. *Signal transduction and targeted therapy*, *6*(1), 426.
- [37] Ferreira, H., Amorim, D., Lima, A. C., Pirraco, R. P., Costa-Pinto, A. R., Almeida, R., ... & Neves, N. M. (2021). A biocompatible and injectable hydrogel to boost the efficacy of stem cells in neurodegenerative diseases treatment. *Life Sciences*, *287*, 120108.
- [38] Butler, D., Moore, D., Glavin, N. R., Robinson, J. A., & Ebrahimi, A. (2021). Facile post-deposition annealing of graphene ink enables ultrasensitive electrochemical detection of dopamine. *ACS Applied Materials & Interfaces*, *13*(9), 11185-11194.
- [39] Daneshmandi, L., Barajaa, M., Tahmasbi Rad, A., Sydlik, S. A., & Laurencin, C. T. (2021). Graphene-based biomaterials for bone regenerative engineering: a comprehensive review of the field and considerations regarding biocompatibility and biodegradation. *Advanced healthcare materials*, *10*(1), 2001414.

- [40] Kujawska, M., Bhardwaj, S. K., Mishra, Y. K., & Kaushik, A. (2021). Using graphene-based biosensors to detect dopamine for efficient parkinson's disease diagnostics. *Biosensors*, *11*(11), 433.
- [41] Ucar, B., & Humpel, C. (2018). Collagen for brain repair: therapeutic perspectives. *Neural regeneration research*, *13*(4), 595.
- [42] Ballios, B. G., Cooke, M. J., Donaldson, L., Coles, B. L., Morshead, C. M., van der Kooy, D., & Shoichet, M. S. (2015). A hyaluronan-based injectable hydrogel improves the survival and integration of stem cell progeny following transplantation. *Stem cell reports*, *4*(6), 1031-1045.
- [43] Grieco, M., Ursini, O., Palamà, I. E., Gigli, G., Moroni, L., & Cortese, B. (2022). HYDRHA: Hydrogels of hyaluronic acid. New biomedical approaches in cancer, neurodegenerative diseases, and tissue engineering. *Materials Today Bio*, 100453.
- [44] Satitsri, S., & Muanprasat, C. (2020). Chitin and chitosan derivatives as biomaterial resources for biological and biomedical applications. *Molecules*, *25*(24), 5961.
- [45] Najahi-Missaoui, W., Arnold, R. D., & Cummings, B. S. (2020). Safe nanoparticles: are we there yet?. *International journal of molecular sciences*, *22*(1), 385.
- [46] Sabourian, P., Yazdani, G., Ashraf, S. S., Frounchi, M., Mashayekhan, S., Kiani, S., & Kakkar, A. (2020). Effect of physico-chemical properties of nanoparticles on their intracellular uptake. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(21), 8019.
- [47] Müller, R. H., Radtke, M., & Wissing, S. A. (2002). Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Advanced drug delivery reviews*, *54*, S131-S155.
- [48] Yu, S. H., Tang, D. W., Hsieh, H. Y., Wu, W. S., Lin, B. X., Chuang, E. Y., ... & Mi, F. L. (2013). Nanoparticle-induced tight-junction opening for the transport of an anti-angiogenic sulfated polysaccharide across Caco-2 cell monolayers. *Acta biomaterialia*, *9*(7), 7449-7459.
- [49] Zhang, J., Zhu, X., Jin, Y., Shan, W., & Huang, Y. (2014). Mechanism study of cellular uptake and tight junction opening mediated by goblet cell-specific trimethyl chitosan nanoparticles. *Molecular pharmaceutics*, *11*(5), 1520-1532.
- [50] Ceña, V., & Játiva, P. (2018). Nanoparticle crossing of blood–brain barrier: a road to new therapeutic approaches to central nervous system diseases. *Nanomedicine*, *13*(13), 1513-1516.
- [51] Kuo, Y. C., Rajesh, R., & Hsu, J. P. (2019). Electrophoretic mobility of neuron-like cells regenerated from iPSCs with induction of retinoic acid-and nerve growth factor-loaded solid lipid nanoparticles. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, *103*, 167-176.

- [52] Wang, L., Zhao, X., Du, J., Liu, M., Feng, J., & Hu, K. (2019). Improved brain delivery of pueraria flavones via intranasal administration of borneol-modified solid lipid nanoparticles. *Nanomedicine*, *14*(16), 2105-2119.
- [53] Scioli Montoto, S., Muraca, G., & Ruiz, M. E. (2020). Solid lipid nanoparticles for drug delivery: pharmacological and biopharmaceutical aspects. *Frontiers in molecular biosciences*, *7*, 319.
- [54] Hsu, S. H., Wen, C. J., Al-Suwayeh, S. A., Chang, H. W., Yen, T. C., & Fang, J. Y. (2010). Physicochemical characterization and in vivo bioluminescence imaging of nanostructured lipid carriers for targeting the brain: apomorphine as a model drug. *Nanotechnology*, *21*(40), 405101.
- [55] Tsai, M. J., Huang, Y. B., Wu, P. C., Fu, Y. S., Kao, Y. R., Fang, J. Y., & Tsai, Y. H. (2011). Oral apomorphine delivery from solid lipid nanoparticles with different monostearate emulsifiers: pharmacokinetic and behavioral evaluations. *Journal of pharmaceutical sciences*, *100*(2), 547-557.
- [56] Tapeinos, C., Battaglini, M., & Ciofani, G. (2017). Advances in the design of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for targeting brain diseases. *Journal of Controlled Release*, *264*, 306-332.
- [57] Ma, X., Luan, Z., & Li, J. (2023). Inorganic nanoparticles-based systems in biomedical applications of stem cells: opportunities and challenges. *International Journal of Nanomedicine*, 143-182.
- [58] Chen, Y., & Feng, X. (2022). Gold nanoparticles for skin drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 122122.
- [59] Sivaji, K., & Kannan, R. R. (2019). Polysorbate 80 coated gold nanoparticle as a drug carrier for brain targeting in zebrafish model. *Journal of Cluster Science*, *30*(4), 897-906.
- [60] Ribeiro, T. C., Sabio, R. M., Carvalho, G. C., Fonseca-Santos, B., & Chorilli, M. (2022). Exploiting mesoporous silica, silver and gold nanoparticles for neurodegenerative diseases treatment. *International Journal of Pharmaceutics*, 121978.
- [61] Brambilla, D., Le Droumaguet, B., Nicolas, J., Hashemi, S. H., Wu, L. P., Moghimi, S. M., ... & Andrieux, K. (2011). Nanotechnologies for Alzheimer's disease: diagnosis, therapy, and safety issues. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, *7*(5), 521-540.
- [62] Yoshiyama, Y., Higuchi, M., Zhang, B., Huang, S. M., Iwata, N., Saido, T. C., ... & Lee, V. M. Y. (2007). Synapse loss and microglial activation precede tangles in a P301S tauopathy mouse model. *Neuron*, *53*(3), 337-351.
- [63] Adams, R. A., Bauer, J., Flick, M. J., Sikorski, S. L., Nuriel, T., Lassmann, H., ... & Akassoglou, K. (2007). The fibrin-derived  $\gamma$ 377-395 peptide inhibits microglia activation and

suppresses relapsing paralysis in central nervous system autoimmune disease. *The Journal of experimental medicine*, 204(3), 571-582.

[64] Luo, S., Ma, C., Zhu, M. Q., Ju, W. N., Yang, Y., & Wang, X. (2020). Application of iron oxide nanoparticles in the diagnosis and treatment of neurodegenerative diseases with emphasis on Alzheimer's disease. *Frontiers in cellular neuroscience*, 14, 21.

[65] Petters, C., Irrsack, E., Koch, M., & Dringen, R. (2014). Uptake and metabolism of iron oxide nanoparticles in brain cells. *Neurochemical research*, 39, 1648-1660.

[66] Singh, N., Cohen, C. A., & Rzigalinski, B. A. (2007). Cerium oxide nanoparticles are neuroprotective for free radical injury and enhance neuronal longevity. In *Proc NY Acad Sci* (Vol. 1122, pp. 219-230).

[67] Rzigalinski, B. A., Meehan, K., Davis, R. M., Xu, Y., Miles, W. C., & Cohen, C. A. (2006). Radical nanomedicine.

[68] Dowding, J. M., Dosani, T., Kumar, A., Seal, S., & Self, W. T. (2012). Cerium oxide nanoparticles scavenge nitric oxide radical ( $\cdot$ NO). *Chemical communications*, 48(40), 4896-4898.

[69] Whiting, M., Rzigalinski, B., & Ross, J. (2009, August). CERIUM OXIDE NANOPARTICLES IMPROVE NEUROPATHOLOGICAL AND FUNCTIONAL OUTCOME FOLLOWING EXPERIMENTAL TRAUMATIC BRAIN INJURY. In *JOURNAL OF NEUROTRAUMA* (Vol. 26, No. 8, pp. A101-A101). 140 HUGUENOT STREET, 3RD FL, NEW ROCHELLE, NY 10801 USA: MARY ANN LIEBERT INC.

[70] Rzigalinski, B. A., Carfagna, C. S., & Ehrich, M. (2017). Cerium oxide nanoparticles in neuroprotection and considerations for efficacy and safety. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 9(4), e1444.

[71] Han, Q., Wang, X., Cai, S., Liu, X., Zhang, Y., Yang, L., Wang, C., & Yang, R. (2018). Quercetin nanoparticles with enhanced bioavailability as multifunctional agents toward amyloid induced neurotoxicity. *Journal of Materials Chemistry.*, 6(9), 1387-1393.

[72] Han, Q., Cai, S., Yang, L., Wang, X., Qi, C., Yang, R., & Wang, C. (2017). Molybdenum disulfide nanoparticles as multifunctional inhibitors against Alzheimer's disease. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 9(25), 21116-21123.

[73] Zhou, M., Xie, L., Fang, C. J., Yang, H., Wang, Y. J., Zhen, X. Y., ... & Peng, S. (2016). Implications for blood-brain-barrier permeability, in vitro oxidative stress and neurotoxicity potential induced by mesoporous silica nanoparticles: Effects of surface modification. *RSC advances*, 6(4), 2800-2809.



[74] Huang, Y., Li, P., Zhao, R., Zhao, L., Liu, J., Peng, S., ... & Zhang, Z. (2022). Silica nanoparticles: Biomedical applications and toxicity. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *151*, 113053.