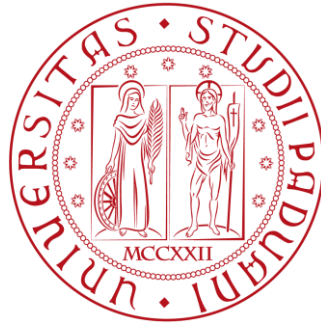


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA



FACOLTÀ DI INGEGNERIA  
CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

Tesina

Applicazioni di idrogeli di peptidi  
auto-assemblanti

*Relatrice:*

Prof.ssa MONICA DETTIN  
(Dipartimento di Ingegneria Industriale)

*Laureanda:*

FEDERICA GIRARDI

25 Luglio 2013

Anno Accademico: 2012/2013



# Abstract

Argomento di questa tesi sono le applicazioni di nuovi biomateriali: gli idrogeli di peptidi auto-assemblanti. Dopo un'introduzione sull'ingegneria tessutale e sui biomateriali attualmente in uso, la tesi si focalizza sugli idrogeli auto-assemblanti e sulle loro applicazioni in campo biomedico. La rigenerazione e il recupero dei tessuti sono una grande sfida per la medicina in quanto sono in grado di influenzare in modo incisivo la qualità della vita dei pazienti. Questo elaborato cerca di porre l'attenzione, in particolar modo, sulla realizzazione di *scaffold* per la crescita di tessuto nervoso, cartilagineo, osseo e cardiaco e sull'applicazione di idrogeli di peptidi auto-assemblanti come vettori per la veicolazione di farmaci (*drug delivery*) e di cellule.



# Indice

<b>Prefazione</b> .....	<b>I</b>
<b>1. Capitolo 1: Ingegneria tissutale e utilizzo di peptidi auto-assemblanti</b> .....	<b>1</b>
1.1 Ingegneria Tissutale.....	1
1.2 Peptidi auto-assemblanti.....	2
1.3 Gli Scaffold e i materiali per la loro realizzazione.....	4
<b>2. Capitolo 2: Applicazioni di Idrogeli di peptidi auto-assemblanti nei tessuti</b> .....	<b>9</b>
2.1 Tessuto Nervoso.....	9
2.1.1 ECM e <i>Scaffold</i> neurali.....	11
2.1.2 Traumi, lesioni e problematiche nel sistema nervoso.....	14
2.1.3 Idrogeli di peptidi auto-assemblanti per la rigenerazione neurale.....	16
2.1.3.1 Rigenerazione del nervo ottico.....	18
2.2 Tessuto Cartilagineo.....	20
2.2.1 Patologie della cartilagine articolare.....	21
2.2.2 Riparazione della cartilagine con idrogeli di peptidi auto-assemblanti	23
2.3 Tessuto Osseo.....	25
2.3.1 Malattie delle ossa.....	26
2.3.2 Rigenerazione del tessuto osseo con idrogeli di peptidi auto-assemblanti.....	28

2.4	Tessuto Cardiaco.....	30
2.4.1	Problematiche cardiache.....	31
2.4.2	Applicazioni di idrogeli di peptidi auto-assemblanti.....	34
<b>3.</b>	<b>Capitolo 3: Idrogeli come Drug delivery system.....</b>	<b>37</b>
3.1	Drug delivery Systems.....	37
3.2	Idrogeli in applicazioni di drug delivery.....	38
3.3	Migliorare la fornitura di Idrogel.....	39
3.4	Applicazioni in Drug delivery.....	41
<b>4.</b>	<b>Capitolo 4: Idrogeli di peptidi auto-assemblanti utilizzati nel delivery di cellule.....</b>	<b>45</b>
4.1	La terapia cellulare.....	45
4.2	Possibili applicazioni di idrogeli di peptidi auto-assemblanti nel delivery di cellule.....	46
	<b>Conclusioni.....</b>	<b>51</b>
	<b>Abbreviazioni.....</b>	<b>53</b>
	<b>Bibliografia.....</b>	<b>55</b>
	<b>Elenco delle tabelle e delle figure.....</b>	<b>63</b>

# Prefazione

I traumi costituiscono una delle principali cause di morte della popolazione mondiale e la principale causa di decessi nella popolazione giovanile dei paesi industrializzati. L'alta incidenza dei traumatismi come causa di decesso o di danni fisici, cognitivi e comportamentali permanenti costituisce un grave problema per la società e un pesante onere economico, sociale e psicologico che coinvolge non solo le vittime, ma anche i familiari e il sistema sanitario [1]. Nonostante i continui progressi tecnologici avvenuti in campo biomedico da circa gli anni ottanta del secolo scorso, la sostituzione di organi danneggiati a causa di traumi e/o malattie rimane un problema fondamentale per la moderna medicina. Generalmente i problemi di fondo sono dovuti agli elevati costi e troppo spesso all'inefficienza delle terapie applicate. Ad aggravare la situazione si aggiunge il fatto che naturalmente il trapianto d'organi è limitato dall'insufficienza di donatori e dai problemi di compatibilità, mentre l'uso di organi artificiali è limitato per motivi tecnici ancora irrisolti.

In questo panorama, grandi aspettative vengono riposte nella medicina rigenerativa e nell'ingegneria tissutale che mirano a riparare e rigenerare cellule, tessuti e organi compromessi da malattia. Tra i biomateriali innovativi più promettenti vi sono gli idrogeli di peptidi auto-assemblanti utilizzati come *scaffold* per i tessuti nervosi, come nanofibre iniettabili per creare un ambiente intramiocardico per la crescita delle cellule endoteliali, e come matrici per la riparazione dei tessuti cartilaginei [2]. Inoltre tali idrogeli sono stati proposti come vettori per *drug delivery* -somministrazione di farmaci-. In particolare recentemente è stata ottimizzata la cinetica di rilascio di farmaci da parte di idrogeli, ampliando le tipologie dei farmaci che possono esserne veicolati. Un terzo campo in cui gli idrogeli di peptidi auto-assemblanti hanno trovato impiego è il delivery di cellule nell'ambito delle terapie cellulari che rappresentano un approccio alternativo e promettente rispetto alla somministrazione di farmaci.





# Capitolo 1

## Ingegneria tissutale e utilizzo di peptidi auto-assemblanti

### 1.1 Ingegneria Tissutale

L'ingegneria tissutale è un campo di ricerca interdisciplinare che unisce le conoscenze dell'ingegneria con quelle della chimica, della fisica, della matematica, della biologia e della medicina al fine di capire le relazioni struttural-funzionali dei tessuti sani o malati del corpo umano, nel tentativo di creare sostituti biologici in grado di ripristinare, migliorare o mantenere il funzionamento dei tessuti viventi. A conferma di ciò, una prima definizione di ingegneria tissutale è stata data dal Dr.Langer:

*"an interdisciplinary field that applies the principles of engineering and life sciences toward the development of biological substitutes that restore, maintain, or improve tissue function or a whole organ" [3]*

Negli ultimi trent'anni sono state sempre più numerose le pubblicazioni e le argomentazioni riguardanti questo settore in evoluzione che si pone come obiettivo la rigenerazione di tessuti del corpo (tessuto nervoso, cardiaco, epiteliale, cartilagineo) attraverso la coltivazione di cellule su apposite strutture dette *scaffold*, per consentire la produzione di nuovo tessuto conseguendo così il fine di eliminare la necessità dell'utilizzo di protesi per ridare funzionalità ad organi e tessuti lesionati.

Una sfida nel campo dell'ingegneria tissutale è quella di seminare e coltivare cellule su *scaffold* tridimensionali, biodegradabili e biorisorbibili, nei quali la dimensione e l'interconnettività dei pori sono parametri importanti; ciò dovrebbe consentire una migliore migrazione delle cellule nei pori, l'apporto di elementi nutritivi e lo scambio di gas. Il successo della penetrazione cellulare all'interno dello *scaffold* è spesso

determinato dall'efficienza della tecnica di semina e dalle condizioni di coltura che svolgono un ruolo cruciale nell'adesione e distribuzione cellulare sullo *scaffold* [4].

L'uso di biomateriali nell'ambito della *Tissue engineering* è in forte crescita. Recenti studi hanno sottolineato quanto siano fondamentali le proprietà fisiche e le dimensioni degli stessi biomateriali che devono essere capaci di imitare le naturali interazioni cellula-ECM.

## 1.2 Peptidi auto-assemblanti

Negli ultimi anni è cresciuto sempre più l'interesse e l'utilizzo di peptidi auto-assemblanti come *scaffold* per la crescita cellulare. L'interesse per questi peptidi è maturato grazie alla loro caratteristica di auto-aggregazione e di capacità di formare strutture 2D e 3D.

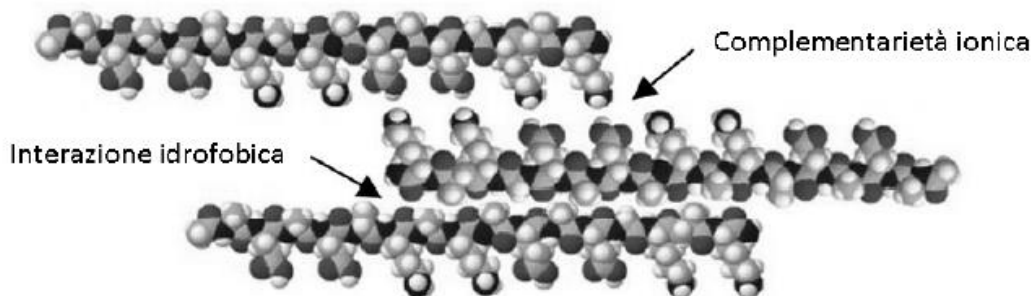
I peptidi auto-assemblanti sono una particolare classe di molecole caratterizzate dalla capacità di organizzarsi spontaneamente in strutture ordinate e stabili, in condizioni di equilibrio termodinamico, grazie alla formazione di legami non covalenti, come legami a idrogeno e ionici, interazioni idrofobiche e le forze di Van der Waals.

Zhang negli anni '90 ha classificato questi peptidi in cinque classi:

- Tipo I (“molecular Lego”): formano idrogeli che vengono utilizzati per creare scaffolds;
- Tipo II (“molecular switch”);
- Tipo III (“molecular hook” e “molecular velcro”): utilizzati nei trattamenti superficiali;
- Tipo IV (“molecular capsule”): finalizzati al trasporto di geni e proteine;
- Tipo V (“molecular cavity”): per la biomineralizzazione.

I peptidi auto-assemblanti sintetici possono essere derivati da proteine naturali oppure sintetizzati *ad hoc*. Sono comunque formati da una zona idrofilica e una idrofobica e hanno la capacità di aggregarsi in soluzione acquosa. L'auto-assemblaggio è dovuto sia alla natura dei singoli amminoacidi, sia alla loro posizione nella sequenza. È quindi

possibile ottenere una determinata struttura secondaria scegliendo e predisponendo opportunamente gli amminoacidi. I peptidi auto-assemblanti, per aggregare, devono possedere due caratteristiche fondamentali: la complementarità (cioè la ripetizione di una determinata distribuzione di carica all'interno della sequenza) e la compatibilità strutturale. Queste esigenze sono perfettamente rispettate dai peptidi ionico complementari, essi si distinguono infatti per l'alternanza di residui positivi e negativi. Inoltre in conseguenza a questa sequenza ordinata di cariche, derivano particolari interazioni elettrostatiche che i peptidi utilizzano, insieme alle forze di Van der Waals e ai legami a idrogeno, per regolare l'auto-aggregazione molecolare (figura 1.1).



**Fig.1.1** Schema di auto-assemblaggio del peptide attraverso interazioni idrofobiche e ionico-complementari.

Argomento di questa tesi sono i peptidi di tipo I, in quanto specifici per la formazione di *scaffold*. Essi assumono generalmente, in soluzione acquosa, una struttura secondaria di tipo  $\beta$ -sheet, caratterizzata da una faccia a carattere ionico con catene laterali cariche positivamente e negativamente e una faccia idrofobica. Proprio grazie a interazioni elettrostatiche come già detto, i piani  $\beta$ -sheet possono assemblarsi in strutture tridimensionali. Infine, fatto da non sottovalutare è che l'auto-assemblaggio dipende da vari fattori quali il pH, il tempo, la concentrazione, la sequenza peptidica e la presenza e tipologia di sale per cui si ha maggior efficacia per la formazione di membrane con l'utilizzo di (in ordine decrescente):  $\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Cs}^+$ .

### 1.3 Gli Scaffold e i materiali per la loro realizzazione

Gli *scaffold* sono strutture che fungono da matrice extracellulare (ECM) e organizzano le cellule in strutture tridimensionali rilasciando sostanze stimolanti, che dirigono la crescita e la formazione del tessuto desiderato. Lo *scaffold* oltre a fornire una struttura di supporto deve essere in grado di far accrescere e diversificare le cellule che vengono fatte attecchire e deve rispondere a precise caratteristiche meccaniche a seconda del tessuto che si vuole rigenerare.

Lo *scaffold* ideale biologicamente compatibile in grado di promuovere l'adesione e la crescita cellulare, dovrebbe rispondere a vari criteri:

- ❖ Le unità di base dovrebbero essere suscettibili di modifiche per rispondere a specifiche esigenze;
- ❖ Lo *scaffold* dovrebbe presentare una velocità controllata di biodegradazione;
- ❖ Non dovrebbe essere citotossico;
- ❖ Dovrebbe possedere proprietà che promuovono interazioni cellula-substrato;
- ❖ Dovrebbe suscitare una minima risposta infiammatoria;
- ❖ Dovrebbe essere chimicamente compatibile con soluzioni acquose e condizioni fisiologiche. [5]

Nella progettazione degli *scaffold* nell'ingegneria tissutale bisogna tener conto non solo dei diversi requisiti sopra citati ma anche del materiale utilizzato per produrli. In base al tipo di tessuto da ricreare e alle sue specifiche applicazioni infatti, verranno utilizzati materiali differenti.

Le caratteristiche principali dei materiali da utilizzare sono la biocompatibilità, non è auspicabile infatti la creazione di una risposta indesiderata da parte dell'organismo, e la biodegradabilità in modo da essere riassorbibili simultaneamente alla crescita dei nuovi tessuti in un tempo ragionevole, senza rilasciare prodotti tossici per l'organismo.

Tra i materiali che possiedono queste caratteristiche e che sono potenzialmente utilizzabili per la creazione di *scaffold* troviamo:

- metalli (acciai inossidabili, leghe di cobalto, leghe di titanio);
- ceramici (biovetri, alluminia, fosfato di calcio);
- polimeri naturali;
- polimeri sintetici;
- compositi;
- idrogel.

## **Metalli**

In passato sono stati ampiamente utilizzati impianti in metallo in ambito chirurgico, in particolare in ambito ortopedico costituendo grandi passi avanti per la medicina. Nonostante tutto possiedono degli svantaggi per l'ingegneria tissutale in quanto non sono biodegradabili e hanno una lavorabilità limitata.

## **Ceramici**

Hanno buona resistenza meccanica, un'elevata durezza e buone proprietà tribologiche ma hanno elevati costi di produzione e sono troppo fragili. Le bioceramiche come l'idrossiapatite, i biovetri attivi, le ceramiche calcio-fosfato, hanno un buon comportamento biocompatibile e bioattivo e per questo sono state utilizzate come riempitivi per le ossa.

## **Polimeri**

I polimeri naturali come il collagene, i glicosamminoglicani (GaGs), chitina e chitosano sono stati utilizzati per riparare nervi, pelle, cartilagine ed ossa. I biomateriali naturali possono simulare molto bene l'ambiente cellulare naturale, tuttavia la diversità e complessità degli stimoli che producono non consentono di avere il pieno controllo sullo sviluppo e sulla differenziazione cellulare, inoltre le loro scarse proprietà meccaniche ne hanno limitato l'uso per la produzione degli *scaffold*. In soluzione a questi problemi sono stati sviluppati molti polimeri sintetici come polianidridi, l'acido poliglicolico (PGA), l'acido polilattico (PLA) e il policaprolattone (PCL).

## Compositi

Costituiti da due o più elementi su scala microscopica o macroscopica. Qualora vogliano essere utilizzati come biomateriali è necessario che ogni componente del composito sia biocompatibile e che l'interfaccia tra i costituenti non costituisca un punto particolarmente debole rispetto all'attacco da parte di fluidi biologici con i quali viene a contatto. Vengono utilizzati come riempitivi per protesi odontoiatriche e ortopediche e, uniti ai polimeri hanno grandi vantaggi vista l'enorme varietà di proprietà, composizioni e morfologia.

## Idrogel

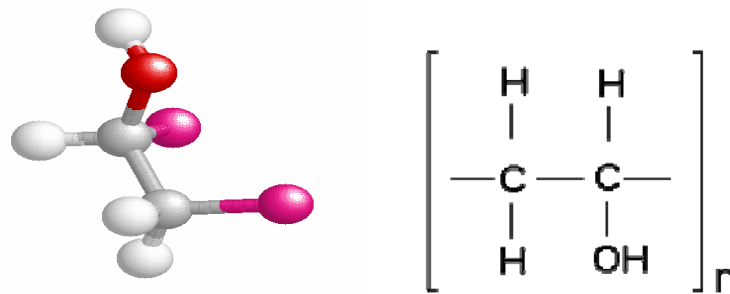
Gli idrogel sono una classe di materiali polimerici idratati (il loro contenuto d'acqua è maggiore del 30% del peso) che vengono utilizzati per varie applicazioni in campo biomedico in particolare per la costruzione di *scaffold*.

Essi sono composti da catene polimeriche idrofile, che possono essere di origine naturale o sintetica. L'integrità strutturale degli idrogel dipende da legami incrociati (*cross-linking*) formati da catene polimeriche (covalenti) e da interazioni fisiche (non-covalenti). Il processo di reticolazione del polimero in soluzione, che porta alla formazione di compartimenti rigonfi d'acqua (*pori*) e quindi alla formazione dell'idrogel vero e proprio, se non è spontaneo, può essere innescato da agenti esterni.

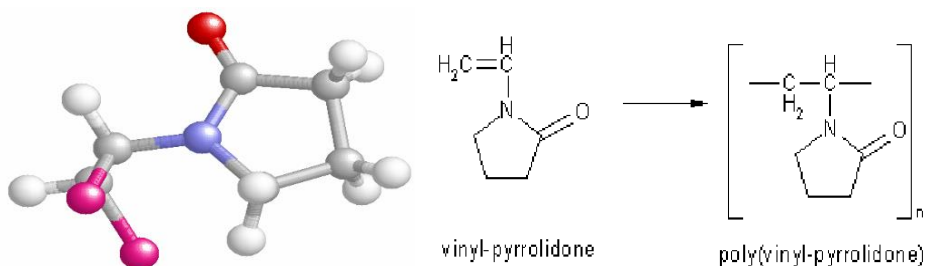
Esistono infatti due principali metodi di polimerizzazione: *cross-linking* fisico e *cross-linking* chimico. Il *cross-linking* fisico prevede la regolazione di parametri quali la pressione, la temperatura, il volume, al fine di innescare particolari processi grazie a cui viene a formarsi una reticolazione senza aggiunta di agenti chimici (*cross-linkers*). Un notevole svantaggio di questo metodo però è il fatto che gli idrogeli presentano delle disomogeneità interne, dovute alla creazione di domini determinati da interazioni idrofobiche o ioniche. Il *cross-linking* chimico invece prevede la formazione di legami covalenti fra le catene del polimero. Per ottenere ciò vengono usate varie metodologie quali le reazioni indotte da reagenti chimici, e ben più rilevanti, l'irraggiamento gamma e l'irraggiamento ultravioletto che garantiscono brevi tempi di reticolazione e risultano convenienti in quanto conferiscono all'idrogel ottime proprietà meccaniche. In breve, la sostanziale differenza fra idrogeli chimici e fisici (comuni gel), sta nel diverso

comportamento assunto in soluzioni acquose: quelli fisici dal momento che sono sprovvisti di forti legami tra le catene, in acqua diventano solubili, quelli chimici invece, sono insolubili a causa dei legami covalenti.

Gli idrogel utilizzati negli *scaffold* sono tipicamente biodegradabili, hanno proprietà strutturali e meccaniche simili all'ECM di molti tessuti e possono essere impiantati in maniera poco invasiva. I materiali che possono essere usati per formare idrogel per *scaffold* sono molto vari, alcuni di questi sono tra i polimeri sintetici: l'acido poliacrilico (PAA), il polivinilpirrolidone (PVP), il polivinil alcol (PVA) e i polipeptidi.



**Fig.1.2** Struttura chimica del monomero e del polimero di PVA. Carbonio (grigio), ossigeno (rosso) idrogeno (bianco), azoto (azzurro). Il colore magenta indica la continuazione della catena.



**Fig.1.3** Struttura chimica del monomero e del polimero di PVP. Carbonio (grigio), ossigeno (rosso) idrogeno (bianco), azoto (azzurro). Il colore magenta indica la continuazione della catena.

Tra i polimeri naturali da cui si possono ricavare idrogel ci sono l'alginato, il chitosano, il collagene, la fibrina, l'acido ialuronico (HA).

Gli idrogel sintetici sono molto utilizzati nell'ingegneria tissutale in quanto le loro proprietà chimiche sono facilmente controllabili e riproducibili.

I polimeri sintetici possono essere prodotti con pesi molecolari specifici, strutture a blocchi, legami degradabili e, proprio queste proprietà, determinano le dinamiche di formazione del gel, la densità dei legami incrociati e le proprietà meccaniche e di degradabilità del materiale.

Gli idrogel derivati da polimeri naturali sono spesso utilizzati in applicazioni di ingegneria tissutale in quanto possiedono componenti o proprietà macromolecolari simili all'ECM naturale. Il collagene ad esempio è la proteina più presente nei tessuti delle ECM dei mammiferi. Si possono inoltre creare fibre di collagene e *scaffold* con delle proprietà meccaniche migliorate dall'introduzione di vari reticolati chimici (gluteraldeide, formaldeide), da trattamenti fisici e dal legame con altri polimeri.

Gli idrogel hanno differenti applicazioni nell'ambito dell'ingegneria tissutale tra i quali *scaffold* più o meno complessi e trasportatori di molecole bioattive; inoltre, vengono applicati alle cellule da trapiantare e in pratica possono venire utilizzati per la formazione di praticamente ogni tessuto corporeo inclusi ossa, nervi, cartilagine e muscoli lisci [6].

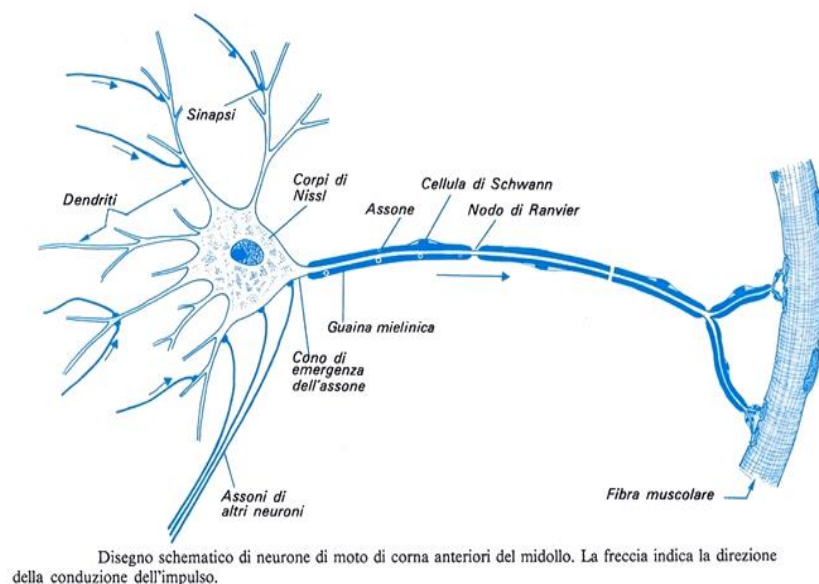


# Capitolo 2

## Applicazioni di Idrogeli di peptidi auto-assemblanti nei tessuti

### 2.1 Tessuto Nervoso

Il tessuto nervoso è composto sostanzialmente da due tipi di cellule: i neuroni e le cellule di sostegno che costituiscono a seconda della grandezza, la nevroglia e la micro nevroglia. I neuroni (figura 2.1.1) sono le unità strutturali e funzionali del sistema nervoso, ognuno di essi costituisce un centro di regolazione e integrazione degli impulsi provenienti da diverse cellule nervose.



**Fig.2.1.1** *Rappresentazione della struttura di un neurone.*

Ogni cellula sviluppa le proprietà di irritabilità (capacità di trasformare in impulsi nervosi le informazioni provenienti dall'esterno) e conducibilità (capacità di trasmettere i segnali nervosi ad altre parti della stessa cellula). Ci sono tre tipi di neuroni:

- sensitivi o afferenti: portano gli impulsi dai recettori periferici al sistema nervoso centrale (SNC);
- motori o efferenti: portano gli impulsi dal SNC agli effettori periferici;
- di connessione: trasmettono i segnali all'interno del SNC.

Sono formati da un corpo cellulare centrale (pirenoforo o soma) provvisto di nucleo e citoplasma e di lunghi prolungamenti tra cui i dendriti e l'assone. L'assone ha funzione centrifuga, serve infatti per trasportare i segnali in zone distanti dal corpo cellulare. I dendriti invece hanno funzione centripeta, trasmettono infatti le informazioni provenienti dall'ambiente esterno o da altri neuroni verso il corpo cellulare dove vengono trasformati in impulsi nervosi. I dendriti sono più corti degli assoni e determinano il collegamento tra cellule neurali. Il contatto tra cellule nervose non avviene in modo diretto ma attraverso particolari strutture dette sinapsi, attraverso cui vengono trasmessi gli impulsi nervosi. Le sinapsi sono particolari zone, delimitate dalla membrana presinaptica del neurone trasmettitore e dalla membrana postsinaptica del neurone ricevente, che assicurano il collegamento funzionale tra i neuroni e tra ogni neurone e le cellule degli organi effettori, quali cellule epiteliali, cellule connettivali, cellule muscolari, ecc. L'impulso elettrico in arrivo provoca il rilascio di un neurotrasmettitore, generalmente di natura chimica, che si combina con i recettori di membrana postsinaptica inducendo un segnale elettrico che viene trasmesso al neurone ricevente. Una volta trasmesso il segnale, lo spazio sinaptico viene liberato e preparato a ricevere l'impulso successivo [7]. Infine, il sistema nervoso non contiene solo neuroni ma anche vasi sanguigni, tessuto connettivo di sostegno (sistema nervoso periferico -SNP-) e la nevroglia composta da cellule gliali, che non fungono solo da isolante tra neuroni ma si occupano anche di trasferire impulsi nervosi tra le cellule.

### **2.1.1 ECM e Scaffold neurali**

Il sistema nervoso centrale è un tessuto molto complicato se messo a confronto con altri organi del corpo umano, in quanto non solo ha una particolare struttura della ECM ma ha anche molte proprietà fisiche particolari. Ad esempio, il tessuto nervoso cerebrale ha un modulo elastico di circa 500 Pa, esiguo rispetto al modulo elastico dei muscoli di circa  $10^4$  Pa o a quello delle ossa di circa  $10^9$ - $10^{10}$  Pa [8]. Queste differenze nelle proprietà meccaniche, nella struttura e nella composizione dell'ECM hanno notevoli effetti sulle funzioni cellulari. La composizione dell'ECM nel sistema nervoso centrale è nettamente differente dalla composizione dell'ECM di altri organi, infatti solitamente si ha una prevalenza di fibronectina e collagene ma in questo caso essi sono praticamente assenti, al contrario si trova un'abbondanza di proteoglicani posti in spazi intracellulari tra neuroni e cellule gliali. Nel cervello inoltre si trova una particolare ECM detta rete perineurale (perineuronal net -PNN-) composta soprattutto da proteoglicani, acido ialuronico, tenascina-C e tenascina-R. Questa matrice non ha solo il compito di fungere da supporto fisico e biochimico ma permette anche le cruciali funzioni omeostatiche per la sopravvivenza delle cellule. Sulla base di queste conoscenze sono stati valutati vari tipi di idrogeli capaci di imitare le caratteristiche biochimiche e meccaniche del sistema nervoso centrale al fine di essere applicati come sostituti. Questi includono derivati di idrogeli come collagene, acido ialuronico (HA) e idrogeli peptidici oltre a idrogeli sintetici, per esempio poliacrilammide e glicole polietilenico (PEG) e altri elencati nella tabella 1.

**Tabella.1** Idrogeli utilizzati per la rigenerazione neuronale [9].

<b>Hydrogel</b>	<b>Gelation mechanism</b>	<b>Comments</b>
<b>Polyacrylamide</b>	Chemical crosslinking	+ Adjustable mechanical properties + Easy control of architecture and chemical composition + Non-immunogenic - Non-biodegradable - Non-neuronal permissive - Neurotoxicity
<b>PEG</b>	Photocrosslinking or Chemical crosslinking	+ Highly biocompatibile + Non-immunogenic + Neuro-protective - Too hydrophilic - Non-biodegradable
<b>Collagen</b>	PH and temperature sensitive, Chemical crosslinking	+ Highly biocompatibile + Injectable - Possible immunogenic - Lower mechanical properties
<b>HA</b>	Chemical crosslinking	+ Highly biocompatibile + Injectable + Non-immunogenic + Chemically modifiable - Highly hydrophilic
<b>Agarose</b>	Thermosensitive	+ Injectable - Non-neuronal permissive - Lacking cell binding domain - Non-naturally enzymatically degradable
<b>Arginate</b>	Ionic crosslinking	+ Easy to crosslink (Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> ...) + Injectable - Net negative charge inhibiting protein adsorption - Non-naturally enzymatically degradable
<b>Chitosan</b>	Ionic and/or Chemical crosslinking, Thermosensitive	+ Highly biocompatibile + Easy modification + Injectable - Only soluble in dilute acid - Inflammatory response
<b>Fibrin</b>	Enzymatic crosslinking	+ Highly biocompatibile + Injectable + Chemically modifiable + Incorporation of bioactive signaling molecules + Enzymatic degradation
<b>Methylcellulose</b>	Thermosensitive	+ Injectable - Limited protein adsorption - Non-naturally enzymatically degradable
<b>Matrigel</b>	Thermosensitive	+ Injectable + Highly biocompatibile - From mouse tumor cells - Immunogenic - Not sure about exact composition
<b>PolySia-based Hydrogels</b>	Diepoxyoctane crosslinking	+ Bioresorbable + Immunological inertness + Highly specific degradation
<b>Peptide hydrogel</b>	PH, temperature and ionic strength sensitive	+ Injectable + Highly biocompatibile - Low mechanical properties
<b>Xyloglucan</b>	Thermosensitive	+ Injectable - Difficult to make

Le proprietà di questi idrogeli, quali la rigidità, le caratteristiche morfologiche e strutturali, influenzano il comportamento delle cellule per quanto concerne il loro movimento, la loro differenziazione, migrazione e proliferazione e il loro attecchimento. Gli idrogeli utilizzati per la rigenerazione del sistema nervoso dovrebbero essere in grado di promuovere la sopravvivenza cellulare cercando allo stesso tempo di mantenere le funzioni principali delle cellule. Essi dovrebbero permettere la penetrazione cellulare e la crescita dei neuroni e naturalmente dovrebbero avere proprietà meccaniche simili a quelle dell'ECM nativa così che le cellule all'interno dell'idrogel riescano a ricevere appropriate informazioni durante la crescita. La figura 2.1.2 sottostante mostra le varie caratteristiche desiderate per uno *scaffold* ideale per la rigenerazione neurale.

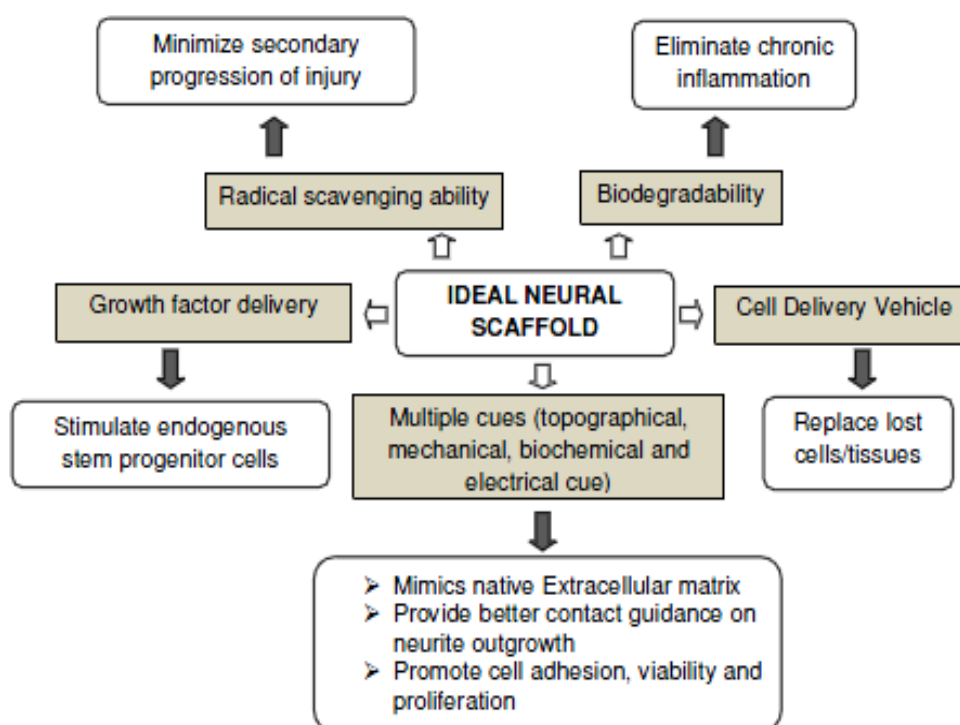
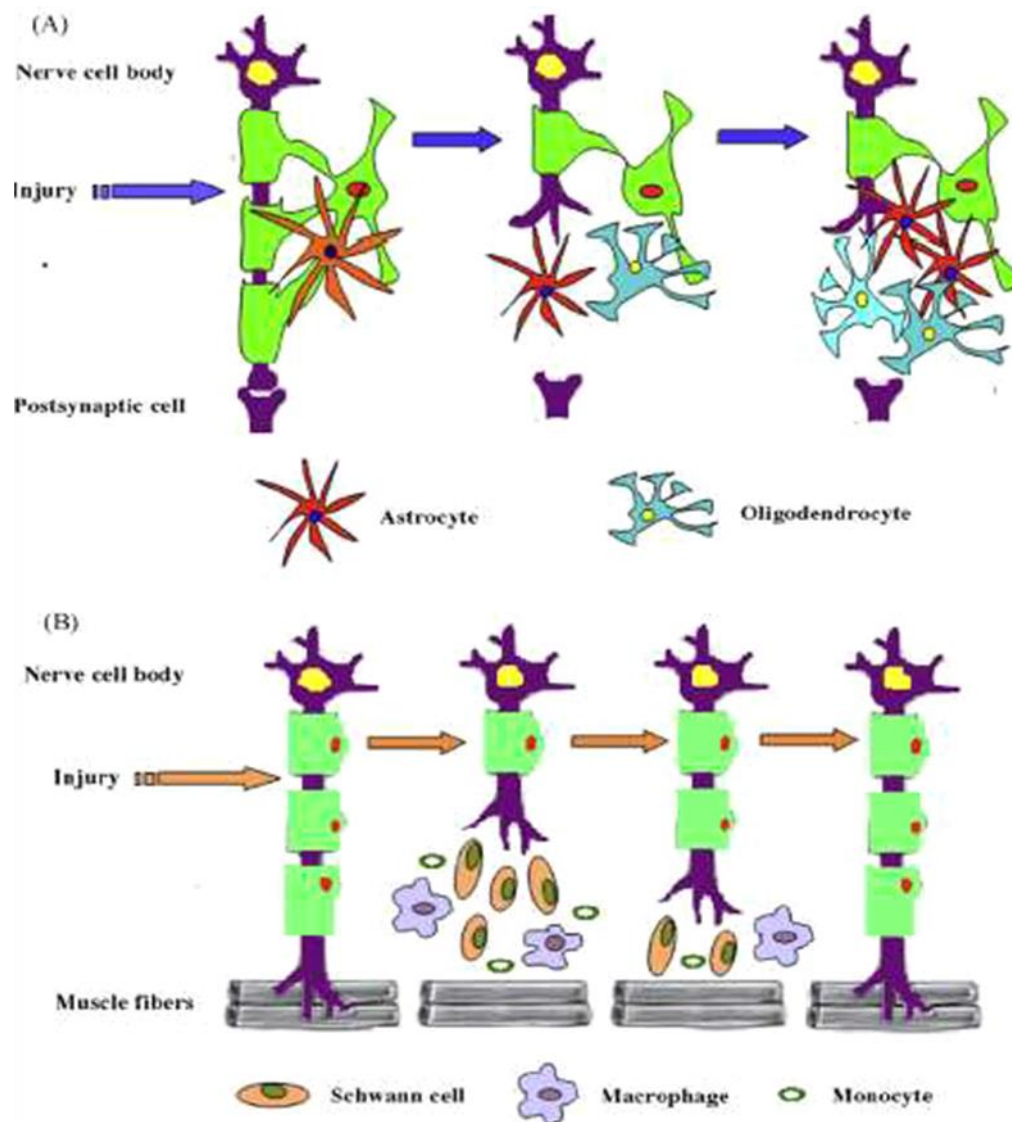


Fig. 2.1.2 Proprietà di uno scaffold ideale [10].

### 2.1.2 Traumi, lesioni e problematiche nel sistema nervoso

Le lesioni del sistema nervoso centrale che colpiscono circa 2 milioni di persone all'anno [11], possono essere determinate da lesioni fisiche o interruzioni neurologiche, spesso infatti si ha la perdita di corpi cellulari neurali, assoni e relativi supporti gliali. Le lesioni fisiche non sono rare e comprendono lesioni dovute a resezione di tumori come neuroma acustico e meningioma del nervo ottico, e altre tra cui lesioni traumatiche al cervello (*traumatic brain injury* -TBI-) e lesioni alla spina dorsale (*spinal cord injury* -SCI-). Non sono meno frequenti le malattie neurodegenerative come ictus cerebrale (*brain stroke*), morbo di Parkinson (*Parkinson's disease* -PD-), Alzheimer (*Alzheimer's disease*) e sclerosi multipla [12]. In tali patologie talvolta viene lesa significativamente solo la sostanza grigia (insieme dei corpi neuronali presenti nel SNC), così che i disturbi sensoriali e muscolari rimangono confinati ai tessuti che scambiano segnali con i neuroni del livello colpito del midollo spinale senza alterare molto le funzioni al di sotto di tale livello. In altri casi invece viene distrutta anche la sostanza bianca (assoni neuronali riuniti in fasci e ricoperti dalla mielina) di un segmento midollare, la lesione interrompe i segnali in verticale impedendo ai messaggi che hanno origine nel cervello di propagarsi al di sotto dell'area danneggiata e impedendo altresì ai segnali sensoriali che provengono da sotto la lesione di diffondersi al cervello. La lesione meccanica, purtroppo non rimane in situ, ma conseguentemente ad essa avviene una propagazione longitudinale attraverso la sostanza grigia fino poi alla sostanza bianca che porta una progressiva situazione di malfunzionamento. Gli assoni danneggiati diventano monconi privi di collegamenti e le loro estremità troncate iniziano a disintegrarsi. In molti casi gli assoni rimangono intatti ma diventano inutilizzabili a causa della perdita del rivestimento mielinico isolante. Al posto dei neuroni, degli assoni o delle cellule, si forma una cavità piena di liquido, o cisti, e le cellule gliali proliferano in modo anomalo, formando la cicatrice gliale. Insieme, cisti e cicatrici, rappresentano una barriera impenetrabile per gli assoni recisi. Il deterioramento secondario del tessuto è dovuto ad un rigonfiamento dei vasi sanguigni che lesionati, non apportano più sostanze nutritive e ossigeno alle cellule, causando la morte di molte di esse. Inoltre le cellule, gli assoni e i vasi sanguigni liberano sostanze chimiche tossiche che vanno a colpire le

cellule sane limitrofe. Per migliorare queste problematiche si è cercato di concentrarsi sul processo di riparazione del tessuto cercando di stimolare la rigenerazione degli assoni danneggiati, inducendo così il loro allungamento e la riconnessione con le appropriate cellule bersaglio.



**Fig.2.1.3** Processo di rigenerazione di un nervo lesionato nel SNC (A) con formazione delle cicatrice gliale e processo di guarigione nel SNP (B) mediato da cellule di Schwann, macrofagi e monociti [13].

È importante evidenziare comunque che dal punto di vista della riparazione delle lesioni, il sistema nervoso centrale (SNC) e il sistema nervoso periferico (SNP) rispondono diversamente; se infatti nel SNP gli assoni sono spesso in grado di ricrescere, nel SNC raramente si è osservata un'autoriparazione del tessuto danneggiato giustificando disfunzioni permanenti susseguite a lesioni e malattie (figura 2.1.3). Inoltre è fondamentale la presenza di fattori estrinseci nel SNP che mancano invece nel SNC come le cellule di Schwann che sono in grado di fornire nutrimento, provvedere alla mielinizzazione degli assoni rigenerati; sintetizzano inoltre i fattori neurotrofici che favoriscono la sopravvivenza neuronale e la crescita assonale e danno origine a strutture indispensabili nel processo di rigenerazione: le bande di Bungner, che orientano la crescita degli assoni. Tali cellule sono assenti nel SNC, dove vi è invece sovrabbondanza di molecole, alcune delle quali presenti nella mielina, che inibiscono attivamente la rigenerazione degli assoni [13].

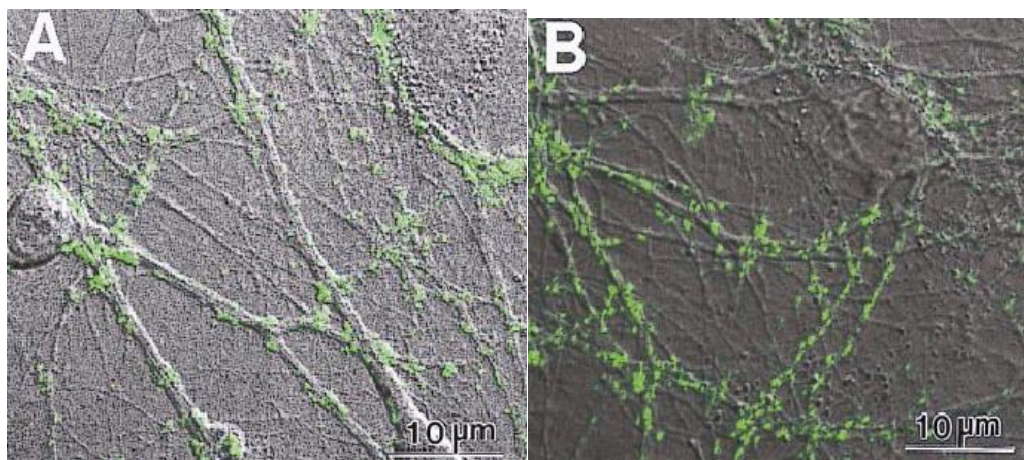
### **2.1.3 Idrogeli di peptidi auto-assemblanti per la rigenerazione neurale**

Per cercare di ridurre o comunque migliorare le problematiche citate nel paragrafo precedente si sono utilizzati idrogeli di peptidi auto-assemblanti. Il più utilizzato nella produzione di *scaffolds* di nano fibre auto-assemblate (SAPNs) per la coltura di cellule neurali è il RAD 16-I (sequenza H-Ala-Arg-Ala-Arg-Ala-Asp-Ala-Asp-Ala-Arg-Ala-Arg-Ala-Asp-Ala-Asp-NH<sub>2</sub>) coniugato ad una sequenza adesiva della laminina (Isoleucina-Lisina-Valina-Alanina-Valina (IKVAV)), in grado di promuovere e dirigere la crescita di neuriti.

Nella riparazione del sistema nervoso centrale, come precedentemente detto, la cicatrice gliale è il principale ostacolo alla rigenerazione assonale dopo una lesione al midollo spinale. Inibire la sua formazione è perciò cruciale per avere successo. Molti gruppi di ricercatori si sono concentrati su questo problema: Tysseling-Mattiati [13] e i loro collaboratori hanno dimostrato che utilizzando uno SAPNs IKVAV è possibile inibire la formazione della cicatrice gliale e al contempo promuovere l'allungamento assonale dopo una lesione al midollo spinale. Un altro gruppo guidato da Silva [13], sviluppò una



struttura più complessa di idrogel proveniente dall'auto-assemblaggio di molecole peptidiche che non contengono solo l'epitopo di germinazione neuronale IKVAV, ma incorporano anche un residuo Glu (fornendo una carica negativa), quattro residui Ala, tre residui Gly, e una coda di 16 carboni. Questo tipo di sequenza idrofila insieme a cationi posti nel mezzo di coltura cellulare, promuove da un lato l'auto-assemblaggio di questo idrogel mediante formazione di legami a idrogeno, dall'altro porta alla creazione di una parte idrofoba che rende sfavorevole il contatto con le molecole d'acqua. Inoltre, incorporando la sequenza IKVAV, queste nanofibre di idrogel hanno dimostrato di essere in grado di inibire ancor più la formazione della cicatrice gliale, migliorare la differenziazione delle cellule progenitrici neurali e promuovere l'allungamento dell'assone. Promotore di studi finalizzati alla ricostruzione neuronale fu anche Zhang che creò PuraMatrix, un particolare idrogel formato attraverso la spontanea aggregazione di oligopeptidi ionici auto-complementari.



**Fig.2.1.4** *Neuroni dell'ippocampo di ratto formano sinapsi attive (A) sulla superficie peptidica, (B) su Matrigel.*

Questo tipo di idrogel ha dimostrato di supportare non solo l'attaccamento cellulare e il processo di differenziazione neuronale, ma anche un'ampia crescita neuronale. Esso risultò molto funzionale anche per la formazione di sinapsi dopo aver attaccato tra loro

neuroni di ratto PC12 e neuroni di topo. Studi approfonditi su cellule neurali di ratto hanno dimostrato che l'utilizzo di idrogeli di peptidi auto-assemblanti non solo promuove l'attecchimento delle cellule stesse sugli *scaffold* con una conseguente crescita neuronale, ma promuovono anche la formazione di connessioni sinaptiche. A conferma di ciò sono state paragonate l'attività neuronale sinaptica su Matrigel (gel contenente collagene di tipo IV) e su peptidi auto-assemblanti (figura 2.1.4) ed esse sono risultate praticamente indistinguibili, ciò implica che l'utilizzo di peptidi auto-assemblanti è un ottimo substrato per la crescita neuronale.

### 2.1.3.1 Rigenerazione del nervo ottico

Il nervo ottico è una sorta di cavo ricoperto da mielina che connette l'occhio al cervello. In esso confluiscono circa un milione di fibre (una per ogni singolo punto del campo visivo) provenienti dalla retina, che convogliano le informazioni alle regioni cerebrali della visione. La mielina che lo riveste è la guaina di rivestimento del tessuto nervoso centrale e periferico; essa è fondamentale per la corretta conduzione di stimoli neurologici compresi quelli visivi.

Le patologie più comuni che colpiscono il nervo ottico sono [14]:

- ❖ Neurite ottica: colpisce soprattutto gli anziani, è un'infezione acuta causata da patologie che inducono demielinizzazione (lesione della mielina) come: malattie infettive (sifilide, tubercolosi, morbillo, epatite, HIV), infiammazioni sistemiche (malattie auto-immuni) e microangiopatie (ischemie, diabete). La neurite ottica inoltre è strettamente legata alla sclerosi multipla (SM); infatti nel 25% dei casi essa rappresenta l'esordio di questa patologia, mentre nel 75% dei casi, dopo lo sviluppo di neurite si hanno ampie probabilità di contrarre la SM. I sintomi più comuni di questa malattia sono: alterazione della percezione dei colori (figura 2.1.5), riduzione improvvisa della vista, visione di lampi al buio, accompagnati da cefalea, nausea, perdita dell'equilibrio ad occhi chiusi e febbre.



**Fig.2.1.5** Simulazione dell'alterata percezione dei colori e della riduzione della luminosità in corso di neurite ottica (a, b) e aspetto edematoso, con i bordi sfumati, della testa del nervo ottico (c). Perdita della guaina mielinica (d).

- ❖ Neuropatia ottica: patologia indolore, porta alla riduzione della vista con conseguente sensazione di annebbiamento e riduzione della percezione dei colori.
- ❖ Malattie del cervello e del sistema nervoso centrale, come l'arterite cronica.

Non meno importanti sono le lesioni provocate da traumi dovuti ad incidenti o a glaucoma. In questi casi il nervo ottico viene danneggiato arrecando una perdita della vista dovuta alla mancanza di trasmissione delle informazioni visive. A differenza di molti altri tessuti del corpo che si rinnovano continuamente e si rigenerano se feriti, le cellule nervose o le loro fibre (assoni) nel SNC, una volta formate del tutto, perdono questa capacità. Un gruppo di scienziati del Massachusetts Institute of Technology (MIT), per riparare questa “tela di ragno”, così definita per la forma e le direzioni tipiche degli assoni, ha iniettato in prossimità della zona lesionata (in criceti) una soluzione di peptidi auto-assemblanti. In questo modo, i criceti, ciechi a causa del nervo ottico danneggiato, hanno recuperato parzialmente la vista attraverso queste nanofibre che hanno stimolato la ricrescita e l'autoriparazione del nervo. Infatti, già dopo 24 ore si è potuto constatare un'attività cellulare e dopo 6 settimane dal trattamento i criceti hanno recuperato parte della vista riuscendo così a trovare il cibo [15]. La sfida che ci si propone per il futuro è quella di estendere l'uso di questi materiali a lesioni importanti

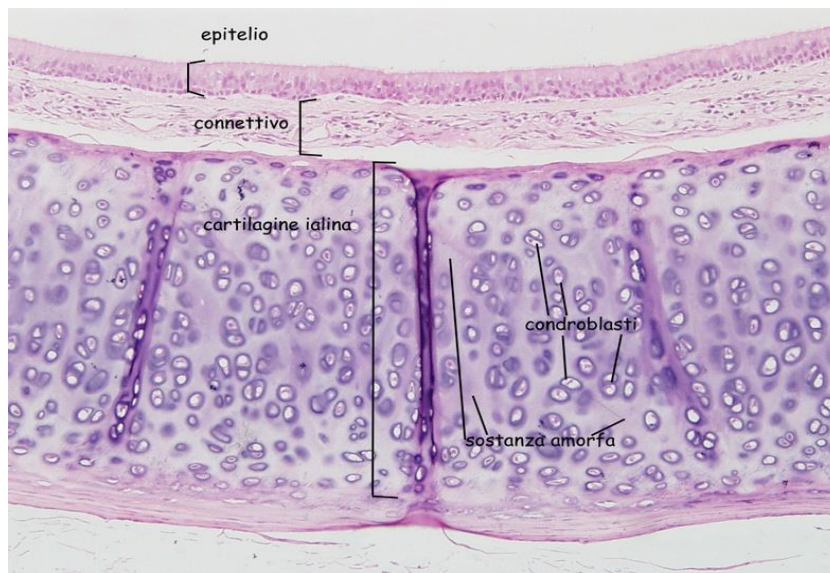
del tessuto nervoso come quelle del midollo spinale, nella speranza di riuscire a curare, anche parzialmente, alcune forme di paralisi.

## 2.2 Tessuto Cartilagineo

Il tessuto cartilagineo è un tessuto connettivo di sostegno dotato di due proprietà fondamentali: resistenza alla tensione ed elasticità. La cartilagine è formata da condrociti o cellule cartilaginee e da un'abbondante sostanza intercellulare composta da fibre immerse in una matrice amorfa. La cartilagine forma l'abbozzo per la maggior parte delle ossa dello scheletro umano, nonché nelle metafisi durante l'accrescimento corporeo, le quali successivamente verranno mineralizzate e sostituite da tessuto osseo. Nell'adulto la cartilagine permane in corrispondenza delle superfici articolari, nei dischi intervertebrali, nello scheletro del padiglione dell'orecchio esterno, partecipa alla formazione della trachea e dei bronchi e nei menischi. Si forma inoltre in seguito a fratture in qualsiasi fase della vita. In tutte le zone in cui è localizzata, fatta eccezione per le superfici articolari, la cartilagine è rivestita da un involucro costituito da tessuto connettivo denso fibroso detto pericondrio [16]. La cartilagine non è vascolarizzata e non è innervata, la nutrizione cellulare avviene per diffusione attraverso la matrice gelificata che la compone. Il nutrimento dei condrociti per diffusione è un processo lento e molto meno efficace della circolazione sanguigna, per questo motivo le capacità rigenerative di questo tessuto sono bassissime. L'ECM della cartilagine è solida, essa è costituita da due componenti distinte: la sostanza intercellulare amorfa o fondamentale e le fibre. È formata dal 40% da collagene, 35-37% da proteoglicani, 14% da altre proteine tra cui le glicoproteine. Nel nostro corpo si distinguono tre tipi di tessuto cartilagineo:

- Cartilagine ialina (figura 2.2.1): di color bianco-bluastro, è la più abbondante nel nostro corpo. Costituisce le cartilagini costali, tracheali, bronchiali, e nel

feto costituisce gran parte dello scheletro che sarà poi sostituito da tessuto OSSEO.



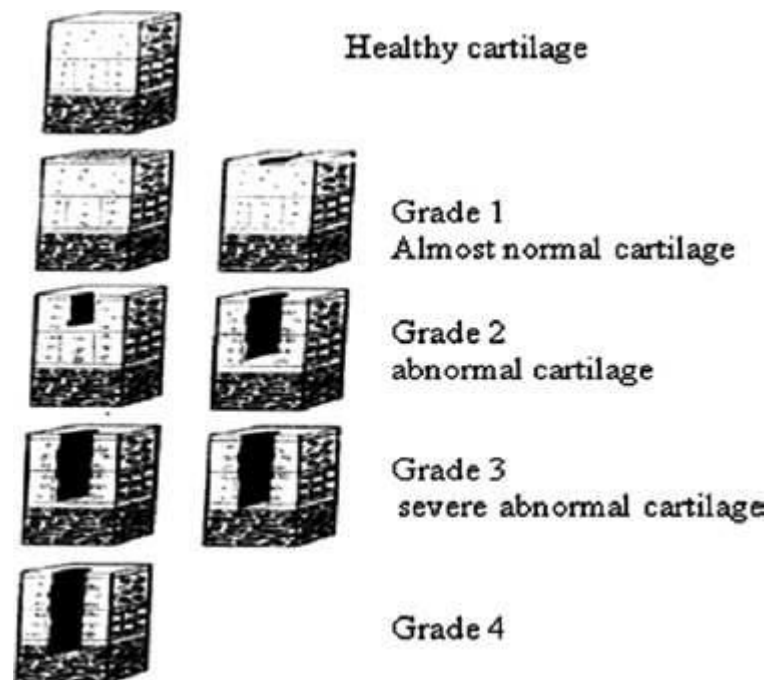
**Fig. 2.2.1** *Cartilagine ialina, sezione di trachea*

- Cartilagine elastica: di color giallo opaco è particolarmente elastica. Costituisce l'impalcatura del padiglione auricolare, dell'epiglottide e di alcune cartilagini laringee
- Cartilagine fibrosa: di color biancastro è particolarmente resistente alle sollecitazioni meccaniche. È diffusa nei tendini, nei dischi intervertebrali, nei menischi delle ginocchia.

### 2.2.1 Patologie della cartilagine articolare

I principali motivi di sofferenza che colpiscono la cartilagine sono dati da lesioni dovute a traumi e ad artrosi.

Trauma: le lesioni della cartilagine articolare sono dovute a traumi da impatto ripetitivo o da una progressiva degenerazione meccanica causata da una specifica attività. Queste lesioni sono fonte di dolore e disturbi funzionali del singolo interessato. Le lesioni articolari sono state classificate secondo la loro profondità dall'ICRS (International Cartilage Repair Society) in 4 gradi (figura 2.2.2):



**Fig.2.2.2** *Classificazione internazionale delle lesioni articolari.*

Una lesione di grado 0 corrisponde alla normale cartilagine sana. Il grado 1 in cui la cartilagine è pressoché normale, può essere suddiviso in due: grado 1A dove la superficie articolare ha un aspetto più compatto e grado 1B dove la superficie articolare presenta rotture o incrinature superficiali. Il grado 2 è considerato anormale ed è profondamente lesionato ma la lesione si mantiene ancora sotto il 50% dello spessore della cartilagine. Nel grado 3A invece, la lesione supera il 50% dello spessore della cartilagine articolare anche se non si estende allo strato calcificato inferiore. Infine nei

gradi 3B e 4, la lesione raggiunge in un primo momento lo strato calcificato e successivamente arriva anche allo strato subcondrale attraversando l'osso.

Artrosi: malattia degenerativa della cartilagine articolare, è il disturbo reumatologico più comunemente sviluppato tanto da essere annoverato come la seconda causa di disabilità dopo le malattie cardiovascolari. Causa di limitazioni nel movimento e impedimenti nel normale svolgimento delle attività quotidiane, colpisce pesantemente soprattutto gli over 65.

Si possono distinguere due tipi di osteoartrite:

- ❖ artrosi primaria o idiopatica che non ha cause note;
- ❖ artrosi secondaria che è causata da lesioni traumatiche, ereditarietà, infiammazione o disturbi del metabolismo.

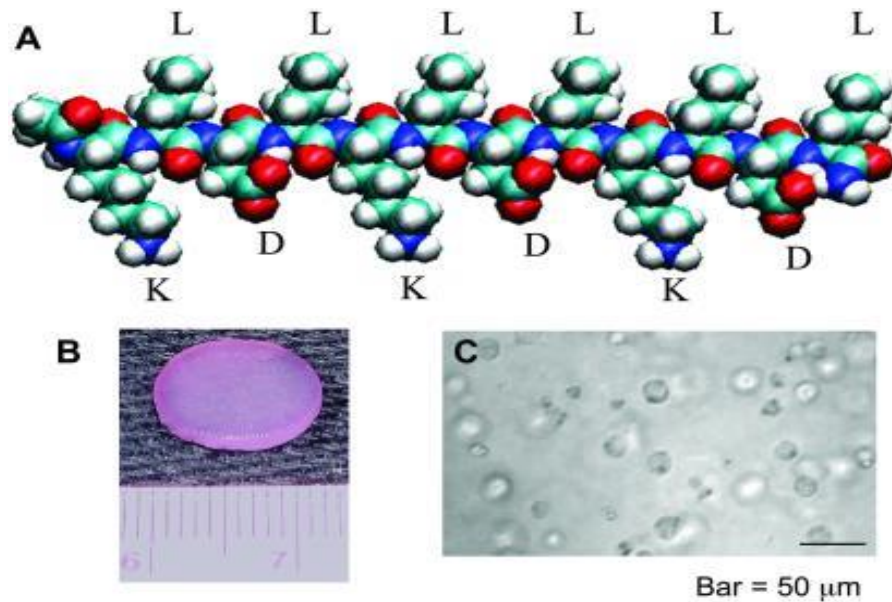
L'osteoartrite porta ad un graduale aumento del dolore nel sito considerato e una compromissione della motilità dell'articolazione, essa è il risultato di una degenerazione del giunto che porta progressivamente ad una perdita di cartilagine articolare. Le articolazioni maggiormente colpite da osteoartrosi sono quelle dell'anca, delle vertebre cervicali e lombari, delle ginocchia e del piede [17].

### **2.2.2 Riparazione della cartilagine con idrogeli di peptidi auto-assemblanti**

La cartilagine è un tessuto connettivo flessibile, in cui i condrociti sono distribuiti in una ECM ricca di proteoglicani e fibre di collagene. Essa ha una limitata capacità di autoriparazione a causa della scarsa vascolarizzazione del tessuto e della bassa irrorazione dei condrociti. Studi hanno dimostrato che i condrociti sottoposti ad un processo di differenziazione durante un processo di coltura cellulare perdono il loro fenotipo, quando invece vengono posti in idrogel mantengono la loro morfologia e sono in grado di ri-differenziarsi. Da ciò si deduce che gli idrogeli sono materiali che possono funzionare come supporto per la coltura di condrociti e per la rigenerazione della



cartilagine. Diversi fattori possono influenzare la rigenerazione della cartilagine e la sua capacità di recuperare o mantenere il fenotipo dei condrociti [17].



**Fig.2.2.3** (A) Modello molecolare di un singolo peptide auto-assemblante KLD-12. I residui alternati idrofobi e idrofili sul backbone promuovono la creazione di piani  $\beta$ -sheet. La lisina carica positivamente (K) e acido aspartico carico negativamente (D) sono sul lato inferiore del  $\beta$ -sheet, mentre la leucina idrofoba (L) è sul lato superiore. Questa struttura molecolare facilita l'auto-assemblaggio tramite interazioni intermolecolari. (B) Condrociti in idrogel di peptide auto-assemblante (C) immagine al microscopio: condrociti incapsulati in idrogel.

L'uso di idrogeli di peptidi auto-assemblanti nella creazione di *scaffold* destinati alla riparazione della cartilagine ha evidenziato buoni risultati sia negli stimoli che hanno portato alla divisione cellulare sia in quelli che hanno indotto una sintesi cellulare con specifici fenotipi. In particolare è stato sviluppato un metodo per incapsulare i condrociti all'interno di tali idrogeli. Dopo 4 settimane di coltura in vitro è stato osservato che i condrociti seminati all'interno dell'idrogel non solo hanno mantenuto la loro morfologia nativa ma hanno anche sviluppato una matrice extracellulare ricca di proteoglicani e collagene di tipo II, indicativa del grado di salute dei condrociti stessi. La formazione di questa nuova ECM, ovviamente influenzata dal tempo, si affianca ad un aumento della rigidità del materiale, indicativo di una buona funzionalità



meccanica del neo-tessuto. Da questi risultati si evidenzia il potenziale di idrogeli di peptidi auto-assemblanti come *scaffold* per la sintesi di cartilagine funzionale come supporto e di una coltura cellulare tridimensionale.

Ad esempio l'utilizzo del peptide KLD-12 con sequenza ACN-KLDLKLKLDL-CNH<sub>2</sub> (figura 2.2.3). Aggiunto di fattori di crescita consente la formazione di neo tessuto cartilagineo e l'integrazione con il tessuto circostante *in vitro*. È stato inoltre dimostrato che l'applicazione di un carico meccanico all'idrogel in cui sono stati incapsulati i condrociti, può stimolare lo sviluppo di una ECM ricca di proteine e proteoglicani [18].

## 2.3 Tessuto Osseo

Il tessuto osseo insieme alla cartilagine fa parte dei tessuti connettivi specializzati per la funzione di protezione e sostegno. L'ECM del tessuto osseo è mineralizzata, cioè composta da minerali che conferiscono ad essa spiccate proprietà meccaniche come durezza e resistenza al carico. Essa è composta da osteociti e da una matrice intracellulare formata per lo più da materiale inorganico. La parte organica, invece, costituita in prevalenza di una parte fibrosa (collagene di tipo I) e di una parte interfibrillare (glicoproteine e proteoglicani), garantisce alla matrice proprietà di elasticità e resistenza alla trazione. Dal punto di vista macroscopico si distinguono due tipologie di osso:

- ❖ spugnoso (o trabecolare): adatto a resistere a sollecitazioni di tipo compressivo, per questo si trova soprattutto nelle ossa brevi, in quelle piatte e nelle epifisi delle ossa lunghe. Ha una struttura alveolare e contiene il midollo osseo;
- ❖ compatto: particolarmente rigido e resistente alla compressione, tensione e torsione, si trova nelle diafisi delle ossa lunghe e riveste il tessuto spugnoso delle ossa brevi e piatte. La sua unità principale è l'osteone, costituito da lamelle

concentriche disposte attorno al canale di Havers che contiene i vasi sanguigni. Intorno vi sono canali più piccoli detti laterali che insieme ai canali haversiani formano un sistema continuo di cavità che permette gli scambi tra sangue e cellule ossee.

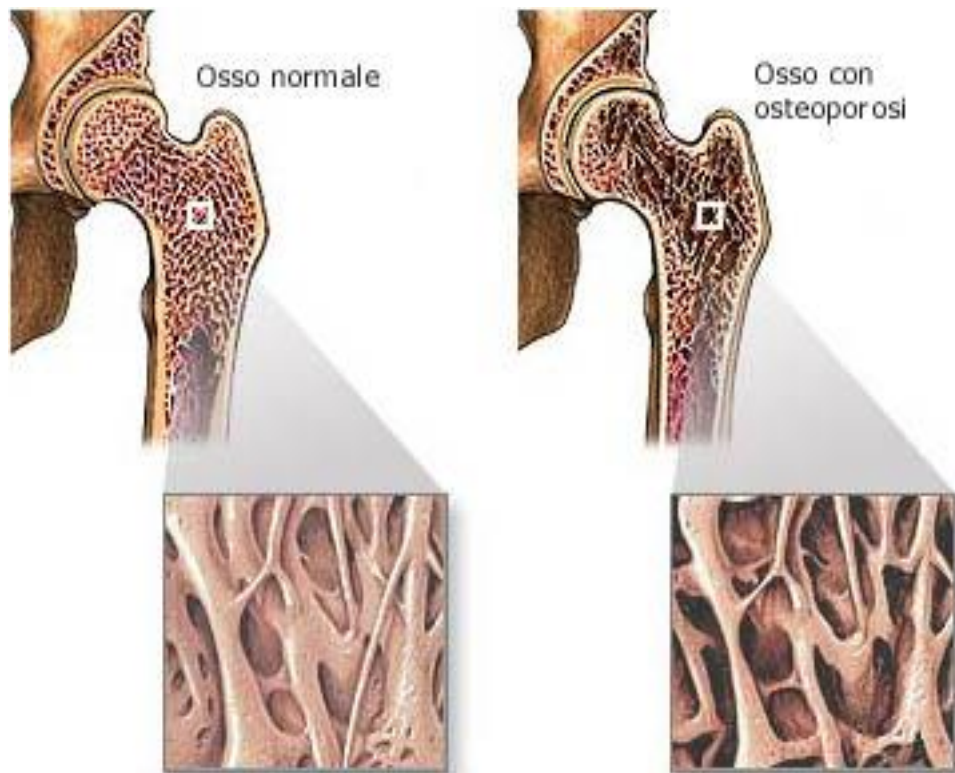
Le cellule che compongono il tessuto osseo e ne regolano il continuo rimodellamento, la riparazione e la rigenerazione tissutale sono cellule osteoprogenitrici:

- osteoblasti: responsabili della sintesi dell'ECM dell'osso e della sua mineralizzazione, hanno forma sferoidale e tendono ad agglomerarsi attorno alle superfici ossee in via di formazione;
- osteociti: sono le cellule tipiche dell'osso maturo responsabili del suo mantenimento e capaci di attivarne il rimodellamento. Hanno una forma stellata con un corpo a forma di lente biconvessa dal quale si diramano numerosi prolungamenti citoplasmatici ramificati;
- osteoclasti: sono le cellule destinate al riassorbimento osseo, sono macromolecole polinucleate che derivano da cellule staminali ematopoietiche midollari. Esse sono trasportate dalla corrente circolatoria fino al sito in cui dovranno agire con un processo di riassorbimento.

### **2.3.1 Malattie delle ossa**

Un sistema scheletrico forte è essenziale per la salute generale e la qualità della vita. Esso infatti non solo funge da sostegno ma protegge anche il cervello, il cuore e i polmoni da eventuali infortuni. Le malattie ossee danneggiano lo scheletro rendendo le ossa deboli e soggette a fratture. La malattia ossea più frequente è l'osteoporosi (figura 2.3.1), che è caratterizzata da un deterioramento degenerativo della struttura ossea. Conseguentemente a ciò si ha un indebolimento delle ossa che diventano dunque facilmente fratturabili. Altre malattie ossee non meno importanti sono il morbo di Paget e l'osteogenesi imperfetta. Il morbo di Paget colpisce indistintamente donne e uomini

anziani e causa deformità e fratture ossee. L'osteogenesi imperfetta invece è una malattia ereditaria che provoca fragilità ossea e fratture nei bambini.



**Fig.2.3.1** Rappresentazione dell'osso dell'anca normale (a sinistra) e affetto da osteoporosi (a destra).

Queste malattie nel loro insieme possono degenerare portando a fratture dolorose e debilitanti fino alla perdita della capacità di camminare o di stare in piedi. Le fratture più comuni si verificano alla spina dorsale e all'anca; queste ultime sono le più devastanti e contano 300.000 ricoveri l'anno. Queste malattie inoltre, oltre ad essere deterioranti comportano anche una spesa sanitaria elevata. Negli Stati Uniti infatti le cure per il trattamento di fratture ossee da osteoporosi costano quasi 18 miliardi dollari

l'anno [19]. Riveste dunque estremo interesse la messa a punto di sostituti del tessuto osseo. Una parte della ricerca avanzata di *scaffold* per la crescita di neotessuto osseo riguarda l'utilizzo di matrici di peptidi auto-assemblanti.

### **2.3.2 Rigenerazione del tessuto osseo con idrogeli di peptidi auto-assemblanti**

L'osso è un tessuto altamente vascolarizzato che fornisce una struttura rigida al muscolo col quale è a contatto. Sebbene il tessuto osseo abbia un'alta capacità di auto-guarigione, la riparazione di grandi difetti ossei resta una sfida. A questo proposito è stato sperimentato l'uso di idrogeli di peptidi auto-assemblanti per incorporare cellule progenitrici o cellule differenziate (osteoclasti) come sostituti per la rigenerazione ossea. I peptidi auto-assemblanti sono stati utilizzati sia in applicazioni *in vitro*, sia nella rigenerazione *in vivo* dell'osso. L'applicazione è promettente in quanto all'interno dell'idrogel, possono essere inglobati non solo fattori di crescita per favorire il processo di adesione e ripopolamento ma anche peptidi adesivi come le sequenze RGD che facilitano l'adesione e la diffusione cellulare. È stato dimostrato infatti che l'utilizzo di idrogeli di peptidi auto-assemblanti con sequenze RGD incorporate, porta una maggiore adesione cellulare e una mineralizzazione della matrice. Nel contributo di Garreta *et al.* [20] si dimostra che fibroblasti embrionali primari di topo (MEF), coltivati in PuraMatrix<sup>TM</sup> (nome commerciale del peptide RAD16-I), si differenziano in cellule dell'osso. Confrontando due strutture, una 2D, l'altra 3D, si trova che i risultati migliori, in termini di mineralizzazione della matrice e sintesi di collagene I, sono dati dalla struttura tridimensionale. Lo *scaffold* 3D inoltre è formato da una sequenza amminoacidica (Arg-Ala-Asp, RAD), molto simile al motivo RGD. Si è infatti dimostrato che un ulteriore arricchimento del peptide con motivi funzionali, non solo incrementa l'adesione e il popolamento da parte delle cellule all'interno dello *scaffold*, ma promuove anche una successiva formazione dell'osso [21]. Ad esempio, per aumentare il potenziale di queste strutture di promuovere l'adesione cellulare, oltre alla sequenza RGD, sono state utilizzate altre sequenze come la sequenza ALK che regola la crescita osteogenica [22].

I peptidi auto-assemblanti sono stati utilizzati anche in saggi *in vivo*. Esperimenti *in vivo* nei ratti hanno infatti dimostrato che la maturità e la mineralizzazione della matrice dell'osso rigenerato sono significativamente migliori all'interno di un idrogel di peptidi auto-assemblanti contenente anche il fattore di crescita BMP-2 [23]. Ulteriori esperimenti *in vivo* sono stati condotti da Misawa *et al.* [24] che hanno iniettato PuraMatrix<sup>TM</sup> nei piccoli difetti ossei nel cranio di topi. Alcuni autori si sono concentrati sul tentativo di indurre la mineralizzazione del tessuto attraverso l'uso combinato di peptidi auto-assemblanti e di polvere di idrossiapatite (HA) [25] che effettivamente, incrementa la mineralizzazione della matrice da parte di cellule MESC. Gli autori di [26] parlano della sinterizzazione di un peptide anfifilico che auto-assembla in soluzioni acquose formando nanofibre e che promuove la nucleazione di cristalli di HA e l'adesione cellulare. Il biomateriale progettato mima un processo di mineralizzazione naturale, dove i cristalli di HA sono disposti parallelamente agli assi delle fibre.

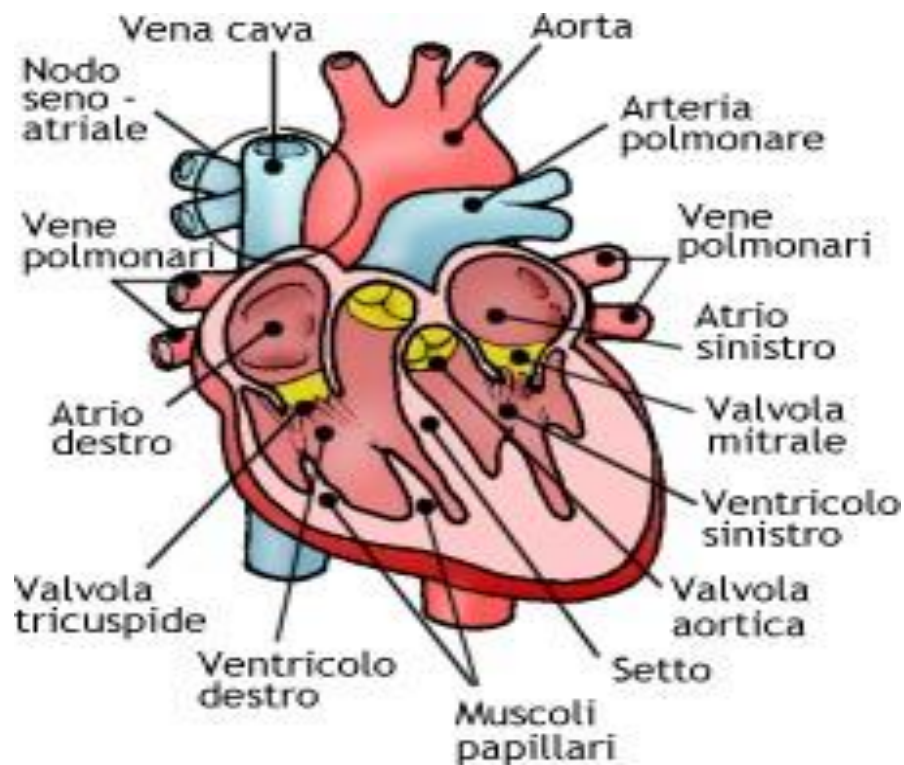
Le strutture auto-assemblanti hanno però una notevole limitazione in questo settore. Esse hanno un'architettura molto somigliante a quella della matrice extracellulare, ma hanno la consistenza di gel e in quanto tali, non possono essere rilasciati. Essi possono essere iniettati localmente per piccoli difetti, ma è molto difficile costruire *patch* in grado di coprire aree più consistenti, così come la loro manipolazione in sala operatoria. Un'altra loro limitazione è la bassa resistenza meccanica che è almeno 3-4 ordini di grandezza inferiore rispetto a quella nativa del tessuto osseo. Per affrontare questa limitazione sono state progettate nuove matrici che uniscono un idrogel con un materiale sintetico tridimensionale biodegradabile in grado di mantenere l'integrità strutturale del tessuto osseo. Ad esempio, ad un gel di alginato è stato unito del fosfato tricalcico (TCP) che ha contribuito a ridurre il tempo di gelificazione aumentandone la rigidità [27].

In definitiva i peptidi auto-assemblanti sono stati studiati come biomateriali potenzialmente utili nelle terapie di ripristino del tessuto osseo in quanto si è dimostrato che forniscono risultati migliori del *Matrigel*<sup>TM</sup> nel promuovere la rigenerazione ossea su difetti cronici prodotti in topi. Tuttavia, se per ovviare a piccoli difetti ossei, la consistenza degli *scaffold* di peptidi auto-assemblanti può risultare adeguata, questa è

insufficiente per la rigenerazione di ossa sottoposte a carico e nel caso di difetti più consistenti.

## 2.4 Tessuto Cardiaco

Il cuore (figura 2.4.1) è un organo cavo di natura muscolare, localizzato nella cavità toracica in una zona centrale chiamata mediastino.



**Fig.2.4.1** *Struttura interna del cuore.*

Il cuore è rivestito esteriormente da una membrana sierosa chiamata pericardio che lo isola e lo protegge. All'interno è suddiviso in quattro cavità distinte, due atri superiori e due ventricoli inferiori. All'esterno si possono riconoscere dei solchi che segnano il

confine tra atri e ventricoli (solco coronario e atrioventricolare), tra i due atri (solchi interatriali) e tra i due ventricoli (solchi longitudinali).

Internamente si trovano il setto interatriale e interventricolare la cui funzione è quella di impedire la comunicazione tra i due atri e i due ventricoli. Tra gli atri e i ventricoli sono presenti due valvole, a destra la tricuspide e a sinistra la bicuspidi o mitrale che permettono il passaggio del sangue dagli atri ai ventricoli. Rispettivamente dal ventricolo sinistro e dal ventricolo destro si dipartono l'arteria aorta e l'arteria polmonare, dove due valvole, aortica e polmonare regolano il passaggio del sangue fra i ventricoli e i suddetti vasi. Nell'atrio destro sboccano tre vene: la vena cava superiore, la vena cava inferiore e il seno coronario, che porta il sangue refluo dalle arterie coronarie. Nell'atrio sinistro confluiscono, invece, le vene polmonari che trasportano il sangue ossigenato di ritorno dai polmoni [28].

Il sangue entra all'interno del cuore attraverso l'atrio destro, viene poi fatto passare al ventricolo destro, successivamente, dopo essere stato ossigenato, attraverso la vena polmonare passa nell'atrio sinistro e infine arriva al ventricolo sinistro dove viene pompato nell'aorta per essere ridistribuito all'interno dell'organismo.

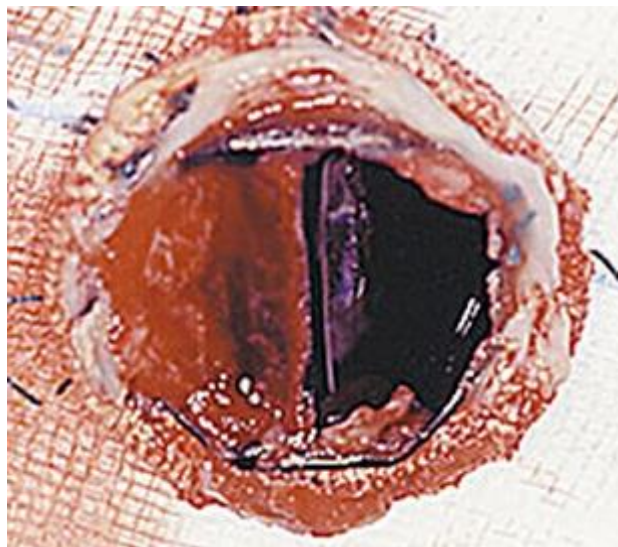
### **2.4.1 Problematiche cardiache**

Il flusso sanguigno all'interno del cuore è regolato dalle valvole cardiache che si aprono e chiudono in base alle sole variazioni di pressione intracardiache. Come già anticipato, nel cuore si distinguono vari tipi di valvole: valvola bicuspidi o mitrale, tricuspide, aortica e polmonare; esse sono costituite da tessuto fibroso e rivestite da endocardio. Le malattie delle valvole cardiache si definiscono valvulopatie e possono essere di due tipi:

- ❖ stenosi: incompleta apertura, il sangue passa attraverso un orifizio più piccolo della norma;
- ❖ insufficienza: incompleta chiusura, parte del sangue torna indietro attraverso la valvola che dovrebbe essere chiusa.

Molto spesso tuttavia stenosi e insufficienza coesistono in diversa misura nella stessa valvola realizzando la cosiddetta stenoinufficienza.

Le valvulopatie possono essere congenite, o acquisite (compaiono nel corso della vita). Queste ultime possono essere di origine degenerativa (solitamente nei pazienti anziani, causate dall'usura della valvola), infettiva (ad esempio endocardite causata solitamente da immunodeficienza dovuta a malattie come diabete o elevato consumo di alcool), ischemica (in caso di infarto miocardico acuto) o traumatica. Solitamente questa malattia ha un decorso lento (anni) e asintomatico, qualora invece insorga rapidamente su una valvola fino a quel momento sana (causa infarto miocardico o traumi), la conseguenza clinica può essere drammatica. Le malattie delle valvole del settore destro del cuore (tricuspide e polmonare) sono rare e in genere dovute a problemi congeniti, mentre quelle che colpiscono le valvole del settore sinistro, in cui la pressione sanguigna è maggiore, sono frequenti [29].



**Fig.2.4.2** Esempio di valvola cardiaca affetta da endocardite. Particolarmente grave è il caso in cui le vegetazioni batteriche o frammenti della valvola cardiaca naturale vengono rimossi dal flusso sanguigno ed immessi nel circolo sistemico.



Solitamente per curare queste malattie si interviene chirurgicamente andando a porre uno *stent* all'interno della valvola per dilatarla (nel caso di stenosi). In caso di persistenza del problema però è necessario intervenire chirurgicamente con una sostituzione della valvola utilizzando protesi valvolari. Le protesi valvolari si differenziano per natura, profilo emodinamico e trombogenicità e possono essere meccaniche (prodotte industrialmente) o biologiche (naturali di origine umana o animale). Gli idrogeli di peptidi auto-assemblanti potrebbero essere utilizzati anche in questo settore al fine di promuovere il ripopolamento cellulare e incrementare la durata dei sostituti valvolari.

Tra le problematiche del tessuto cardiaco possiamo citare anche quelle dovute ad infarto miocardico. Le principali conseguenze di un infarto, infatti, sono blocchi atriali o ventricolari, la fibrillazione e la tachicardia. In alcuni casi di infarto, la porzione di parete del muscolo cardiaco non più contrattile, si assottiglia e si cicatrizza dando vita ad un aneurisma ventricolare. Infatti nei giorni successivi all'infarto inizia un processo di fagocitosi dei cardiomiociti morti, con una successiva proliferazione di fibroblasti e accumulo di collagene che formano un denso tessuto cicatriziale. Conseguenze meno drastiche vedono comunque una necrosi del tessuto e un assottigliamento della zona infartuata con un successivo deterioramento della funzione meccanica della pompa cardiaca. In rimedio a questi problemi sono stati condotti studi sperimentali su *scaffold* che, impiantati, non solo riescano a fermare o rallentare il rimodellamento del tessuto e la formazione della cicatrice ma promuovano anche il ripopolamento cellulare. Le proprietà di uno *scaffold* ideale sono riassunte nella Tabella 2.

Recenti studi di tissue engineering hanno dimostrato come, attraverso l'utilizzo di idrogeli, siano stati ottenuti risultati incoraggianti dal punto di vista della medicina rigenerativa per la riparazione cardiaca che offrono buone prospettive per una migliore e duratura qualità della vita nei pazienti infartuati.

**Tabella.2** Criteri per il successo dell'ingegneria del tessuto cardiaco: i requisiti per le cellule e la matrice di supporto.

Categories	Assessments
Cells	Survive in the harsh infarcted area
	Protected from neutrophils attacks
	Potential to be cardiomyocytes
	Integrate with neighboring cardiac tissue
	Easy to isolate and expand <i>in vitro</i>
	Non-immunogenic
...	
Matrix	Sufficient strength to reinforce weakened heart wall
	Cell-friendly micro-environment for survival and differentiation
	Cardiac mimicking mechanics
	Nontoxic
	Degradable
...	

### 2.4.2 Applicazioni di idrogeli di peptidi auto-assemblanti

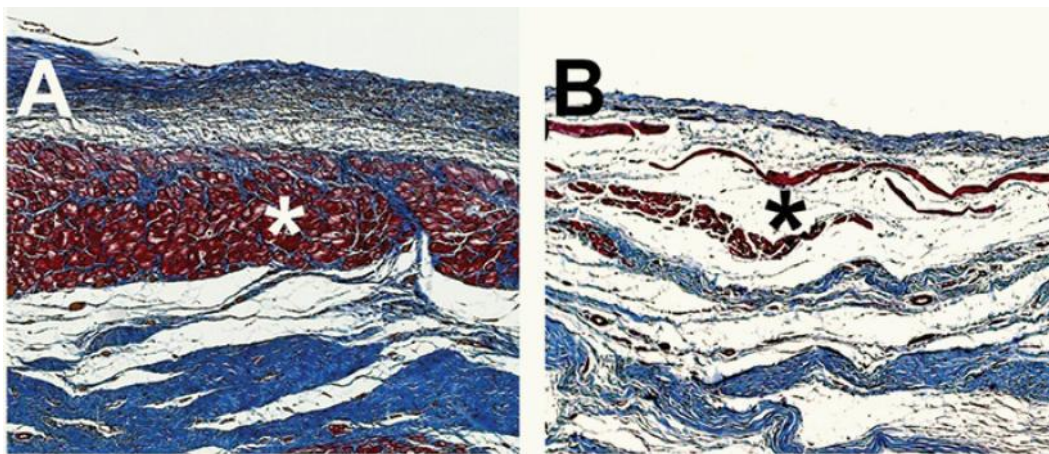
Le protesi valvolari biologiche attualmente impiegate vengono ottenute da valvole porcine preventivamente decellularizzate e fissate con gluteraldeide.

Questo processo chimico stabilizza le proteine, ma porta anche ad una graduale calcificazione della valvola che è destinata a durare in media solo dieci anni. Inoltre, questi trattamenti non sono in grado di promuovere la ricolonizzazione delle matrici da parte delle cellule del ricevente, fatto che, non solo permetterebbe una durata maggiore dell'impianto ma garantirebbe alla valvola una capacità di modificarsi durante la crescita, fondamentale soprattutto nel paziente pediatrico.

Al fine di promuovere la capacità di *self-seeding* è dunque auspicabile evitare il trattamento con gluteraldeide e incentivare la ricolonizzazione della bioprotesi da parte delle cellule del ricevente.

A questo proposito sono stati condotti studi sperimentali trattando tessuto pericardico bovino e porcino decellularizzato con metodi detergente-enzimatici, non con gluteraldeide ma con idrogeli di peptidi auto-assemblanti al fine di favorire l'adesione e la proliferazione cellulare non solo superficiale ma anche interna allo *scaffold*.

Si è riusciti a creare degli *scaffolds* per bioprotesi valvolari graditi alle cellule, consentendo un completo ripopolamento *in vitro*, apportando così, notevoli miglioramenti nel campo della chirurgia valvolare [30].



**Fig.2.4.3** Immagini microscopiche di tessuto cardiaco di maiali danneggiato da infarto mostrano la crescita di nuovo tessuto muscolare cardiaco (indicato in rosso, figura A) dopo il trattamento con un idrogel iniettabile rispetto ad un cuore non trattato (Figura B, a destra).

Studi recenti fatti da bioingegneri alla *University of California*, hanno dimostrato in uno studio condotto su maiali (Figura 2.4.3), che l'uso di idrogeli di peptidi auto-assemblanti è in grado di riparare i danni subiti dopo un infarto migliorandone le danneggiate funzioni cardiache. Il gel iniettato forma infatti uno *scaffold* nelle aree danneggiate del cuore, favorendo la creazione di un ambiente miocardico favorevole alla ricostruzione tessutale. Tuttavia, sempre più persone sopravvissute a infarti miocardici finiscono per andare in insufficienza cardiaca. A tal proposito, si è dimostrato come, questi idrogeli possano aumentare la funzionalità del muscolo

cardiaco riducendo il tessuto cicatriziale nella regione danneggiata. Gli animali trattati con questo idrogel biocompatibile non hanno subito alcun effetto negativo come infiammazioni, lesioni o aritmie cardiache. Inoltre, campioni di sangue umano hanno mostrato che il gel non ha avuto effetto sulla capacità di coagulazione del sangue, che sottolinea la biocompatibilità del trattamento per l'uso nell'uomo [31].

# Capitolo 3

## Idrogeli come Drug delivery system

### 3.1 Drug delivery System

Il *drug delivery* riguarda lo sviluppo di sistemi alternativi per l'indirizzamento dei farmaci nell'organismo. Esso ha come obiettivo quello di circoscrivere l'effetto biologico del farmaco su una data tipologia cellulare, migliorandone l'efficacia e riducendo la tossicità della terapia. Il sistema per *drug delivery* che riguarda materiali con dimensioni macro ( $>1\text{mm}$ ), micro ( $100- 0.1 \mu\text{m}$ ), nano ( $100 - 1 \text{nm}$ ), può alterare la distribuzione dei farmaci e la cinetica di rilascio e, in alcuni casi può offrire una riserva di farmaco nel tessuto *target* che può così evitare continue nuove somministrazioni. Le micro particelle di interesse biomedico hanno dimensioni comprese tra  $5 \text{nm}$  e  $2 \mu\text{m}$  e sono realizzate in matrice polimerica di origine sintetica, semisintetica o naturale al cui interno è presente il farmaco. I polimeri utilizzati si differenziano in:

- ❖ non-degradabili: poliuretani, PMMA, PE, PVP, idrogeli;
- ❖ bioerodibili: copolimeri di acido polilattico e poliglicolico, poliortoesteri, polianidridi.

La velocità di rilascio del farmaco dalla particella dipende dalla diffusione del farmaco attraverso le maglie del reticolo polimerico.

Per i materiali bioerodibili la cinetica di rilascio dipende dall'erosione (degradazione chimica o biochimica) che avviene in massa per i polimeri idrofili o in superficie per quelli idrofobi.

Un fronte di ricerca molto attivo è rappresentato dagli idrogeli che, sviluppati a partire dagli anni '60, sono strutture polimeriche reticolate capaci di assorbire acqua o

soluzioni saline fino a 10-10000 volte il loro peso. Con tali sistemi si può pensare ad un rilascio “intelligente” legato alle diverse condizioni di rigonfiamento (PH, temperatura, campi magnetici).

Le nano particelle infine hanno il vantaggio di passare nei capillari e poter penetrare nelle cellule bersaglio.

## 3.2 Idrogeli in applicazioni di drug delivery

Grazie alla loro struttura tridimensionale e alle proprietà idrofiliche gli idrogeli vengono comunemente utilizzati come “veicolatori” di farmaci. Essi possono presentarsi in varie forme, come lastre, microparticelle, nanoparticelle, rivestimenti e pellicole. La loro struttura altamente porosa può essere facilmente regolata controllando la densità dei legami incrociati (*crosslinking*) nella matrice. I farmaci inglobati nella matrice, verranno poi rilasciati con una cinetica dipendente dal coefficiente di diffusione della molecola all'interno della matrice stessa. Infatti come già anticipato nel paragrafo precedente, i benefici di idrogel per la somministrazione di farmaci sono dati dal fatto che riescono a mantenere un'elevata concentrazione locale di farmaco nei tessuti circostanti per un periodo prolungato.

I vantaggi dovuti all'utilizzo di questo biomateriale sono la biocompatibilità, promossa dal notevole contenuto d'acqua all'interno dell'idrogel e dalla somiglianza fisico-chimica, compositiva e meccanica con la matrice extracellulare nativa, e la biodegradabilità che negli idrogel può avvenire per via enzimatica, idrolitica o ambientale (per esempio può essere dovuta al PH, alla temperatura, al campo elettrico). Gli idrogel sono anche piuttosto deformabili e possono conformarsi alla superficie cui vengono applicati, inoltre in alcuni casi presentano proprietà “bioadesive”, vantaggiose nel momento in cui si richiede una loro immobilizzazione al sito di applicazione.

Gli svantaggi degli idrogel sono dovuti principalmente alla bassa resistenza alla trazione anche se in alcune applicazioni di *drug delivery* come nei casi di applicazione sottocutanea, questo problema non è rilevante. Ben più importanti sono i problemi

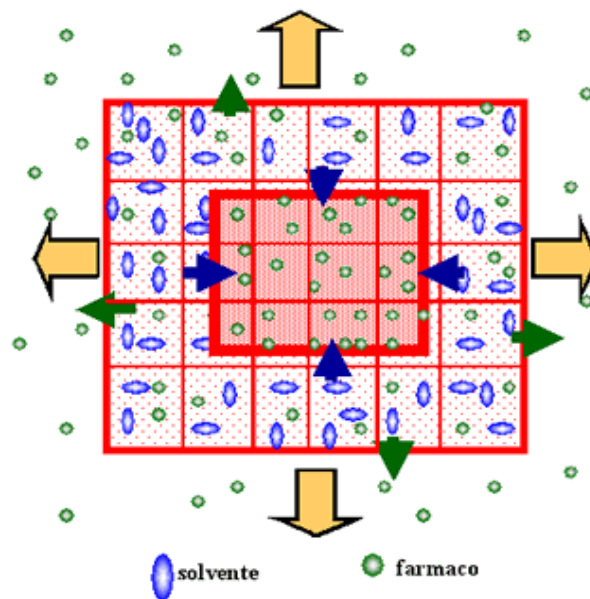
dovuti alla quantità e omogeneità di caricamento del farmaco nell'idrogel, in particolare questo problema si presenta con farmaci idrofobi. L'alto contenuto d'acqua e le grandi dimensioni dei pori spesso possono provocare un veloce rilascio del farmaco, di qualche ora o qualche giorno. Infine, non tutti gli idrogel sono sufficientemente deformabili per essere iniettati e necessitano dunque l'impianto chirurgico [32].

### 3.3 Migliorare la fornitura di Idrogel

Gli idrogel utilizzati in *drug delivery* vengono solitamente preparati all'esterno del corpo per poi essere riempiti di farmaci e successivamente introdotti nel corpo. Il principale svantaggio di questo approccio è che il materiale preformato deve essere impiantato e vista l'elevata elasticità del materiale spesso si esclude la sua estrusione attraverso un ago. Questo problema può tuttavia essere aggirato se si trasforma il gel in micro o nano particelle. In alcune applicazioni gli idrogel possono anche essere formati *in situ* anche se ovviamente questo porta a dover considerare altri problemi come ad esempio l'esposizione a raggi UV necessaria per la polimerizzazione del materiale. In alternativa, possono essere usati polimeri lineari non-reticolati come veicolo.

Generalmente la velocità di rilascio del farmaco da una matrice polimerica lineare è inversamente proporzionale alla viscosità [33]. Tuttavia può essere difficile se non impossibile sciogliere il polimero di interesse ad una concentrazione sufficientemente elevata per controllare la velocità di rilascio del farmaco in misura desiderata. Anche se ciò fosse possibile, la tensione di snervamento del materiale risultante potrebbe essere così elevata da rendere impossibile l'iniezione, altresì la viscosità potrebbe essere elevata a tal punto che la resistenza di scorrimento in un dispositivo di estrusione stretto e/o lungo (ago ad esempio) sarebbe proibitiva. Inoltre, se le catene polimeriche idrosolubili non sono disposte in un reticolo, il materiale, dopo essere stato iniettato *in vivo* in ambiente acquoso, si gonfia e si scioglie in poche ore. Date queste considerazioni, ci si è concentrati su soluzioni di polimeri che si presentano in forme lineari all'esterno del corpo, e che sono quindi facilmente iniettabili, ma che, all'interno del corpo si presentano in forma di gel, fornendo la capacità di un prolungato rilascio di

farmaci. In figura 3.1 è riportato uno schema in cui viene descritto il rilascio di un farmaco da un gel. Una volta messo a contatto con un solvente esterno (le catene polimeriche sono schematizzate dalle linee rosse) il gel si rigonfia. Mentre il volume del gel aumenta (freccette gialle), il farmaco è rilasciato (freccette verdi). Durante il rilascio esiste ancora una zona gel non rigonfiata che va restringendosi progressivamente (freccette blu) fino a scomparire permettendo il completo rilascio del farmaco [34].

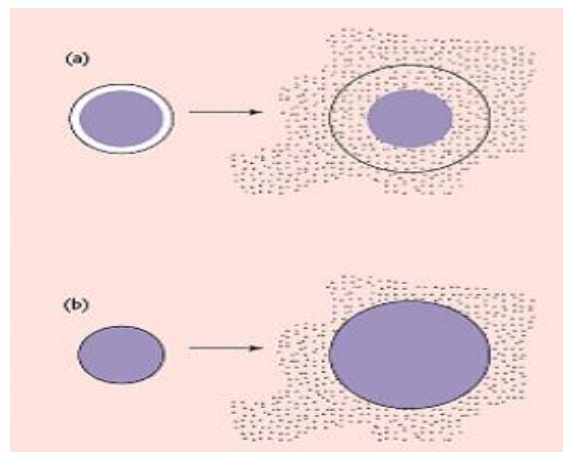


**Fig.3.1** Rappresentazione schematica del rilascio di farmaco da un gel

Esistono inoltre due specifici sistemi di rilascio di farmaci tramite idrogeli:

- ✓ Sistema a serbatoio: il farmaco è contenuto nel serbatoio e la membrana esterna di idrogel rigonfiandosi apre le porosità e rilascia il farmaco (figura.3.2(a)).
- ✓ Sistema a matrice: l'idrogel contiene il farmaco che viene rilasciato per rigonfiamento dell'intero sistema grazie all'apertura dei canali delle porosità (figura.3.2(b)).



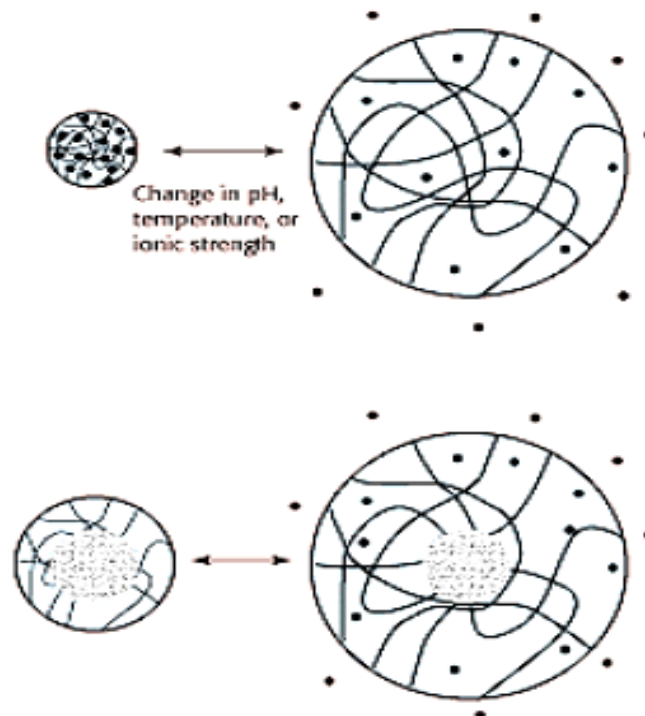


**Fig.3.2** Rappresentazione del rilascio controllato di farmaci con sistema a serbatoio (a) e sistema a matrice (b).

### 3.4 Applicazioni in Drug delivery

Le principali applicazioni di idrogeli in questo campo trovano realizzazione nella somministrazione di farmaci per via orale, oculare, rettale, epidermica e sub cutanea.

Il *drug delivery* per via orale è stato il metodo più utilizzato nelle applicazioni farmaceutiche degli idrogel. Solitamente il farmaco viene rilasciato nel momento in cui si ha un cambiamento del PH, della temperatura, o di interazioni ioniche. Essi, nel tratto orale, possono rilasciare farmaci in quattro regioni specifiche: la bocca, lo stomaco, l'intestino tenue e il colon, incrementando localmente la concentrazione del farmaco e di conseguenza aumentando l'assorbimento del farmaco nel sito di rilascio. Questi idrogeli sono stati utilizzati per il trattamento di malattie periodontali, infezioni virali e tumori al cavo orale.



**Fig.3.3** Esempio di trattamento per via orale.

Il *drug delivery* oculare è solitamente limitato dagli impedimenti fisiologici quali l'ammiccamento, la bassa permeabilità della cornea e la lacrimazione che inibiscono il corretto rilascio di farmaco nell'occhio. Infatti, le convenzionali gocce oculari tendono ad essere rapidamente eliminate dall'occhio e conseguentemente, l'assorbimento di farmaco è limitato. Al contrario, sospensioni e pomate si trattengono nell'occhio ma possono provocare sgradevoli sensazioni al paziente. Queste limitazioni hanno promosso uno studio di sistemi di rilascio di farmaci a base di idrogeli capaci di offrire un tempo di permanenza prolungato dei farmaci a livello oculare e una migliore sopportabilità. I farmaci possono infatti essere rilasciati in un tempo più prolungato e ad una velocità costante per via transdermica e favoriscono maggior confort grazie al loro elevato contenuto d'acqua.

La via rettale è sfruttata per rilasciare tanti tipi di farmaci, anche se l'approvazione del paziente è variabile a causa della scomodità dell'applicazione. Questa via è solitamente

usata per trattare localmente malattie associate al retto come le emorroidi. Inoltre, essendo i farmaci assorbiti nella parte inferiore del retto, il principio attivo arriva direttamente nel circolo sistemico, evitando il primo passaggio epatico. Gli idrogel, risolvono i problemi causati dalle convenzionali forme farmaceutiche rettali, garantendo una buona bioadesività capace di far permanere a lungo il principio attivo nella zona interessata [35].

La pelle umana è facilmente raggiungibile da una persona e la grande superficie di cui dispone la rende un potenziale sito di somministrazione di farmaci, sia localmente che sistemicamente. L'uso di idrogeli (che in questo caso inglobano soprattutto nitroglicerina e idrocortisone [36]) induce un effetto calmante sulla pelle senza eventuali effetti occlusivi/oleosi causati solitamente mediante l'applicazione di pomate.

Nell'orecchio, i farmaci somministrati sono solitamente acquosi o a base di oli. La principale limitazione di questi composti è il loro scarso mantenimento in situ causato ad esempio dalla posizione eretta del paziente. L'uso di idrogel garantirebbe una distribuzione locale del farmaco con un'azione ad effetto prolungato [37].



# Capitolo 4

## Idrogeli di peptidi auto-assemblanti utilizzati nel delivery di cellule

### 4.1 La terapia cellulare

La terapia cellulare è una forma di trattamento medico che si basa sulla somministrazione di cellule nel corpo per scopi terapeutici, diagnostici e di profilassi. Le cellule utilizzate possono essere autologhe (dello stesso paziente su cui si effettua la terapia) od eterologhe (provenienti da un altro donatore). L'uso di cellule come prodotto medicinale è in forte espansione, infatti negli ultimi anni, le conoscenze sulla biologia della differenziazione cellulare e i progressi compiuti in campo immunologico ed ematologico hanno permesso l'identificazione fenotipica e funzionale di cellule staminali progenitrici e cellule differenziate e specializzate in funzioni immunologiche distinte, in grado di essere isolate e manipolate *in vitro* per il successivo impiego clinico. Inoltre, la caratteristica fondamentale che separa le nuove terapie cellulari da procedure come le trasfusioni, i trapianti o le vaccinazioni, è la ricerca di un trattamento specifico e selettivo, sia per un particolare tipo cellulare che per un singolo individuo. La specificità delle cellule è stata infatti sfruttata per ottenere azioni selettive e localizzate, evitando di interessare i tessuti sani adiacenti. In linea di principio possiamo distinguere terapie cellulari che sono rivolte al reintegro di tessuti danneggiati, e terapie cellulari che hanno come principale obiettivo quello di indurre una risposta immunologica o di tipo protettivo nei confronti di malattie infettive o tumori. La terapia cellulare, tuttavia, è notevolmente limitata dalla bassa sopravvivenza cellulare; a questo proposito, interviene in aiuto l'ingegneria tissutale che offre una potenziale soluzione a questo problema generando biomateriali innovativi che migliorano la sopravvivenza e l'attecchimento delle cellule trapiantate. In questo panorama, alternativo rispetto alla

somministrazione di farmaci, hanno trovato impiego gli idrogeli di peptidi auto-assemblanti che rappresentano una classe di biomateriali del tutto innovativi e promettenti per il *delivery* di cellule.

## **4.2 Possibili applicazioni di idrogeli di peptidi auto-assemblanti nel delivery di cellule**

Negli ultimi anni, lo sviluppo di nuove tecnologie ha portato ad un fiorire di sperimentazioni cliniche che hanno come oggetto la preparazione di cellule normali o geneticamente modificate che verranno poi utilizzate nelle terapie cellulari. Qui di seguito, si vuole fare una panoramica su quelle che sono le applicazioni di idrogeli di peptidi auto-assemblanti più sviluppate nel campo del delivery di cellule per terapie cellulari.

### **Riparazione di danni al sistema nervoso**

Recentemente è stato riconosciuto anche al sistema nervoso la capacità di ripararsi e proliferare in età adulta [38]. Questo ha sollecitato l'uso di cellule endoteliali o di cellule staminali (cellule primitive non specializzate, riescono a trasformarsi in diversi tipi di cellule del corpo grazie al processo di differenziazione) in grado di secernere fattori di crescita capaci di indurre la proliferazione neuronale. I traumi alla spina dorsale e al midollo spinale con conseguente formazione della cicatrice gliale impediscono l'autoriparazione del danno neurale e la ricostruzione delle connessioni nervose. Il possibile trapianto nel punto del trauma di cellule staminali neuronali potrebbe essere un approccio efficace [39]. L'uso di idrogeli di peptidi auto-assemblanti che isolano queste cellule e, una volta impiantate permettono loro una buona adesione *in situ*, sta prendendo sempre più piede nelle terapie della medicina rigenerativa. Vacanti *et al.* [40] hanno dimostrato che le cellule neurali all'interno di idrogel non solo sopravvivono ma riescono anche a proliferare *in vitro*. Cheng *et al.* [40] inoltre sono

riusciti a recuperare parzialmente la funzione degli arti posteriori di ratti colpiti da traumi alla spina dorsale, grazie ad innesti di cellule neurali rivestite con idrogeli di peptidi auto-assemblanti. Questi nuovi biomateriali inoltre sono fondamentali in quanto riescono a permettere la somministrazione di fattori di crescita all'interno del tessuto. Ad esempio Sun *et al.* [41] utilizzarono idrogeli per somministrare fattori di crescita al tessuto nervoso di ratti al fine di ristabilire le funzioni del nervo sciatico.

### **Riparazione di cartilagini e articolazioni**

I danni alle articolazioni causati da traumi o da fenomeni degenerativi, sono una delle principali cause di riduzione della qualità della vita. La coltivazione *in vitro* di progenitori cellulari o di condrociti e il successivo impianto *in vivo* per la ricostruzione del menisco danneggiato, sta diventando una possibile alternativa alla sostituzione con articolazioni artificiali [42]. Benya e Shaffer hanno dimostrato che è possibile isolare condrociti di ratto provenienti dalla cartilagine articolare ed espanderli *in vitro*. In aggiunta Grande *et al.* [43] sono riusciti ad isolare condrociti autologhi e impiantarli in conigli affetti da traumi articolari. Compton *et al.* e Green *et al.* [43] inoltre hanno sviluppato metodi in grado di isolare cheratinociti da utilizzare successivamente per innesti finalizzati alla rigenerazione di pelle ustionata.

### **Riparazione di danni al tessuto osseo**

Spesso in seguito ad incidenti o alla presenza di masse tumorali consistenti, vengono rimosse ampie porzioni di ossa. La terapia classica permetteva solo l'inserimento di sostegni artificiali. La possibilità di coltivare *in vitro* i precursori degli osteociti e di impiantarli successivamente nel tessuto osseo con l'ausilio di idrogeli, renderà, a breve, possibile ottenere la ricrescita ossea in tempi più brevi. Per esempio dopo aver impiantato osteoblasti rivestiti di idrogeli di peptidi auto-assemblanti all'interno di tessuto osseo di topi, si è osservata una rigenerazione ossea con formazione di osso spugnoso e osso del femore solo dopo 4 settimane [17]. Un'ulteriore conferma è stata

data da studi su tessuto osseo di topi nei quali sono stati impiantati osteoblasti incapsulati all'interno di idrogeli di peptidi auto-assemblanti. In questo caso è stato confermato che questi biomateriali sono davvero fondamentali per la rigenerazione ossea, infatti promuovono la proliferazione e la differenziazione cellulare [44].

### **Riparazione di danni al tessuto cardiaco**

Dopo un infarto del miocardio, la zona in cui viene a mancare l'irrorazione sanguigna da parte dei capillari ostruiti va incontro a un rapido processo degenerativo e il miocardio viene sostituito da tessuto cicatriziale. Per evitare la formazione del tessuto cicatriziale è necessaria una rapida rivascolarizzazione del tessuto e una proliferazione delle cellule precursori per la ricostruzione del miocardio. Le cellule ideali per riparare il tessuto cardiaco sono i cardiomiociti.

A questo proposito sono stati testati cardiomiociti di origine fetale e neonatale che hanno però provocato aritmie. Sono stati sperimentati anche mioblasti scheletrici che hanno dimostrato avere una buona tolleranza con l'ambiente circostante, tuttavia, anche in questo caso, persiste l'insorgenza di aritmie. Una possibile soluzione per questo problema è l'uso di cellule staminali che possono proliferare e differenziarsi in cardiomiociti. Queste cellule vengono isolate e innestate all'interno del tessuto cardiaco avvolte con idrogeli di peptidi auto-assemblanti che ne promuovono la sopravvivenza, la crescita e la differenziazione [45]. Christman *et al.* [46] hanno isolato cellule muscolari da cuore di maiale, e dopo averle poste all'interno di un idrogel auto-assemblante, le hanno iniettate direttamente nelle regioni danneggiate del cuore suino. Essi hanno dimostrato che questa metodologia è in grado di promuovere la rigenerazione cellulare e migliorare la funzione cardiaca dopo un infarto.

Dopo tre mesi dal trattamento, gli animali hanno infatti registrato un miglioramento del 20% nel movimento della parete cardiaca e una riduzione del 10% della cicatrice del tessuto cicatriziale.



## **Riparazione del tessuto muscolare**

Le distrofie muscolari sono un gruppo di malattie che si manifestano con una perdita progressiva del tessuto muscolare. Non esiste una cura farmacologica per questo tipo di malattie degenerative che spesso portano alla morte del paziente. Negli ultimi anni sono state studiate nuove tecniche per rigenerare e ricostruire muscoli colpiti da danni acuti o malattie degenerative quali la distrofia muscolare. Numerose e diverse situazioni possono portare a un danno o degenerazione del muscolo scheletrico e data la limitata capacità di auto riparazione di quest'ultimo, spesso l'unica alternativa è una terapia di ricostruzione. Cesare Gargioli *et al.* [47] sono riusciti ad incapsulare i mesoangioblasti (Mabs), cellule staminali/precursori muscolari, in un idrogel di supporto. I Mabs incapsulati nell'idrogel, sono stati successivamente impiantati in muscoli di topi con infiammazione cronica e tessuto sclerotico (affetti quindi da distrofia muscolare a stadi avanzati). Si è osservato che le cellule rivestite di idrogel che sono state impiantate, aumentano la loro sopravvivenza e l'attecchimento rispetto alle stesse cellule iniettate in soluzione salina. Questi studi gettano le basi per nuove sperimentazioni miranti ad aumentare l'efficacia delle terapie cellulari per malati con forme localizzate di distrofia muscolare o altri disturbi che portano a danni del tessuto muscolare scheletrico, come ernie e rilassamento degli sfinteri.



# Conclusioni

Tutti i giorni milioni di persone nel mondo subiscono traumi di ogni genere, molti dei quali generano danni permanenti. Questi problemi, oltre che fisicamente, colpiscono duramente le vittime anche dal punto di vista psicologico ed economico. Conseguentemente, il bisogno di tessuti umani trapiantabili per sostituire, riparare o migliorare la funzione di un organo era, e rimane, pressante. Negli Stati Uniti sono quasi 50 milioni le persone che vivono grazie a terapie basate su organi artificiali, inoltre, si stima che nei paesi industrializzati circa una persona su cinque con più di 65 anni necessita di questi trattamenti. Tuttavia, benché le attuali tecnologie per sostituire organi, come i trapianti e le apparecchiature per dialisi, abbiano salvato molte vite, si tratta ancora di soluzioni imperfette, che comportano pesanti conseguenze per i pazienti. A questo proposito, sono molte le speranze che la medicina rigenerativa e l'ingegneria tessutale ripongono nella messa a punto di nuovi biomateriali capaci di contribuire alla ricostruzione di tessuti danneggiati.

Questa tesina, ha cercato di mettere in luce, seppur brevemente, alcune delle più interessanti applicazioni di nuovi biomateriali come gli idrogeli di peptidi auto-assemblanti. Questi materiali, capaci di auto-assemblarsi in strutture tridimensionali dopo essere stati iniettati nel tessuto, riescono per la maggior parte delle volte, ad imitare le funzioni delle ECM proprie del tessuto stesso.

I risultati più promettenti sono stati ottenuti nelle applicazioni del tessuto nervoso, dove, l'uso di idrogeli, ha consentito la creazione di *scaffold* che hanno favorito una crescita e una proliferazione neuronale, consentendo anche il recupero dell'attività sinaptica. Proprio in questo ambito, la ricostruzione del nervo ottico e il conseguente parziale recupero della vista, sottolineano il ruolo straordinario di questi biomateriali. *Scaffold* di idrogeli auto-assemblanti per la rigenerazione tessutale hanno dato buoni risultati sperimentali anche nelle applicazioni per tessuto cartilagineo, osseo e cardiaco. Infatti le proprietà intrinseche di questi biomateriali permettono, ancora una volta, di creare all'interno del tessuto lesionato, un ottimo ambiente intracellulare capace di indurre una

crescita e un ripopolamento cellulare e di conseguenza una ricostruzione del tessuto in questione. Tuttavia, sebbene finora siano stati ottenuti notevoli risultati, gli studi e le sperimentazioni nella creazione di *scaffold* sempre più simili all'ECM nativa, sia dal punto di vista funzionale che strutturale, sono ancora numerosi.

L'uso di idrogeli di peptidi auto-assemblanti ha dato buoni risultati anche in applicazioni di *drug delivery* e *delivery* cellulare. Il fatto che essi siano facilmente iniettabili crea i presupposti per terapie più mirate e meno invasive, garantendo un rilascio controllato del farmaco e migliorandone la cinetica. In aggiunta, la loro capacità di inglobare cellule, comprese cellule staminali e progenitrici, in grado di differenziarsi in cellule proprie di specifici tessuti e conseguentemente di riparare lesioni, risulta essere alquanto promettente.



# Abbreviazioni

**Ala** = Alanina

**Arg** = Arginina

**Asp** = Asparagina

**ECM** = Matrice extracellulare

**Glu** = Glutammato/ Acido glutammico

**Gly** = Glicina

**PE** = polietilene

**PLA** = acido polilattico

**PMMA** = polimetilmetacrilato

**PVP** = polivinilpirrolidone

**RGD** = Arginina- Glicina - Aspartato

**SNC** = Sistema nervoso centrale

**SNP** = Sistema nervoso periferico







# Bibliografia

[3] Alessia Luciani, *Matrici polimeriche biodegradabili porose ottenute attraverso sinterizzazione di micro particelle*, Tesi di Dottorato di ricerca in ingegneria dei materiali e delle strutture, Fcacoltà di Ingegneria, Università degli Studi di Napoli Federico II.

[4] Thevenot P, Nair A, Dey J, Yang J, Tang L. Method to Analyze Three-Dimensional Cell, *Distribution and Infiltration in Degradable Scaffolds*. Tissue Eng Part A 2008.

[5] Todd C.Holmes, Sonsoled de Lacalle, Xing Su, Guosong Liu, Alexander Rich, Shuguang Zhang, *Extensive neurite outgrowth and active synapse formation on self-assembling peptide scaffolds*.

[7] Carlo di Bello, *Biomateriali Introduzione allo studio dei materiali per uso medico*, Pàtron Editore Bologna 2004.

[8] Lu Y., Franze K., Seifert G., Steinhauser C., Kirchhoff F., Wolburg H., Guck J., Janmey P., Wie E., Kas J., Reichenbach A., *Viscoelastic properties of individual glial cells and neurons in the CNS*, Proc Natl Acad Sci USA 2006;103;17759-64.

[9] Xiaowei Li, Eleni Katsanevakis, Xiaoyan Liu, Ning Zhang, Xuejun Wen, *Engineering neural stem cell fates with hydrogel design for central nervous system regeneration* 12 March 2012, p.1109.

[10] Anuradha Subramanian, Uma Maheswari Krishnan and Swaminathan Sethuraman, *Development of biomaterial scaffold for nerve tissue engineering: Biomaterial mediated neural regeneration*, Journal of Biomedical Science 2009.

[11] Bani-Yaghoub, Tremblay, Nzau, Gangaraju S., Chitty D., Zurakowski B. and Sirkoska M.: *Neurogenerative strategies in the brain: emerging significance of bone morphogenetic protein7(BMP7)*. Biochem.Cell. Biol, 86(5), 361-369, 2008.

- [12] Xiaowei Li, Eleni Katsanevakis, Xiaoyan Liu, Ning Zhang, Xuejun Wen, *Engineering neural stem cell fates with hydrogel design for central nervous system regeneration* 12 March 2012, p.1106-1107.
- [13] Ilaria Mazzonetto, *Materiali biomimetici per l'ingegneria dei tessuti neurali*, Tesi di laurea in ingegneria biomedica, Università degli Studi di Padova, 2010-2011.
- [17] Raphael M. Ottenbrite, Kinam Park, Teruo Okano, *Biomedical Application of Hydrogels Handbook*.
- [18] J.Kisiday, M. Jin, B. Kurz, H. Hung, C. Semino, S. Zhang and A. J. Grodzinsky, *Self-assembling peptide hydrogel fosters chondrocyte extracellular matrix production and cell division: Implications for cartilage tissue repair*, Published online 2002 July 15.
- [20] E. Garreta, E. Genové, S. Borrós, C.E. Semino, *Osteogenic differentiation of mouse embryonic stem cells and mouse embryonic fibroblasts in a three-dimensional self-assembling peptide scaffolds*, Tissue Eng., vol. 12, pp. 2215–2227, 2006.
- [21] H. Hosseinkhania, M. Hosseinkhanib, F. Tianc, H. Kobayashic, Y.Tabata, *Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in self-assembled peptide-amphiphile nanofibers*, Biomaterials, vol. 27, pp. 4079–4086, 2006.
- [22] A. Horii, X. Wang, F. Gelain, S. Zhang, *Biological designer selfassembling peptide nanofiber scaffolds significantly enhance osteoblast proliferation, differentiation and 3-D migration*, PloS ONE, vol. 2, pp. 190–199, 2007.
- [23] Chung Y-I, Ahn K-M, Jeon S-H et al (2007) J Contr Release 121:91–99.
- [24] H. Misawa, N. Kobayashi, A. Soto-Gutierrez, Y. Chen, A. Yoshida, J.D. Rivas-Carrillo, N. Navarro-Alvarez, K. Tanaka, A. Miki, J. Takei, T. Ueda, M. Tanaka, H. Endo, N. Tanaka, T. Ozaki, *PuraMatrix™ facilitates bone regeneration in bone defects of calvaria in mice*, CellTransplant., vol. 15, pp. 903–910, 2006.

- [25] E. Garreta, D. Gasset, C. Semino, S. Borròs, *Fabrication of a three-dimensional nanostructured biomaterial for tissue engineering of bone*, *Biomol. Eng.*, vol. 24, pp. 75–80, 2007.
- [26] J.D. Hartgerink, E. Beniash, S.I. Stupp, *Self-assembly and mineralization of peptide-amphiphile nanofibers*, *Science*, vol. 294, pp. 1684–1688, 2001.
- [27] Luginbuehl V, Wenk E, Koch A et al (2005) *Pharm Res* 22:940–950.
- [30] Annj Zamuner, Tesi magistrale in Ingegneria chimica e dei processi industriali, *Progettazione di valvole cardiache “self-seeding”: peptidi auto-aggreganti come “filler” per pericardio decellularizzato*, Università degli Studi di Padova, 2011-2012.
- [32] Todd R. Hoare, Daniel S. Koahane, *Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges*, article, 19 January 2008.
- [33] Talukdar MM, Vinckier I, Moldenaers P, Kinget R., *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1996;85(5):537-40.
- [34] Concetta Ruocco, *Meccanismi di rilascio di farmaci da un doppio strato polimerico per applicazioni biomedicali*, Tesi in Principi di ingegneria chimica, Università degli studi di Salerno, 2009/2010.
- [35] Roberto Tozzi, *Nuovi Idrogeli per l'ingegneria Tissutale ed il Drug Delivery*, Tesi di dottorato, Dipartimento farmaceutico, Università di Parma, 26-mar 2010.
- [36] Kim MK, Chung SJ, Lee MH, Cho AR, Shim CK. *Targeted and sustained delivery of hydrocortisone to normal and stratum corneum-removed skin without enhanced skin absorption using a liposome gel*, *J. Control. Release* 1997; 46: 243-251.

- [37] K. Pali, A. K. Bathia and K. Majudar, *Polymeric Hydrogels: characterization and Biomedical Applications –A mini review*.
- [38] Rao M., *Stem and precursor cells in the nervous system*, J Neurotrauma. 2004;21:415-427.
- [39] McDonald JW, Becker D, Holekamp TF, Howard M, Liu S, Lu A, Lu J, Platik MM, Qu Y, Stewart T, Vadivelu S., *Repair of the injured spinal cord and the potential of embryonic stem cell transplantation*, J Neurotrauma. 2004;21:383-393.
- [40] Martin P. Vacanti, *Neural stem cells*, Principles of Tissue Engineering, Second Edition
- [41] Elena Bozza, Tesi di laurea magistrale in ingegneria biomedica, *Matrici elettrofiliate di peptidi auto-assemblanti per l'ingegneria del tessuto osseo*, Università degli Studi di Padova, 26 ottobre 2010.
- [42] Ochi M, Adachi N, Nobuto H, Yanada S, Ito Y, Agung M., *Articular cartilage repair using tissue engineering technique--novel approach with minimally invasive procedure*, Artif Organs. 2004;28:28-32.
- [43] John M. McPherson e Ross Tubo, *Articular Cartilage Injury*, Principles of Tissue Engineering, Second Edition.
- [44] Akihiro Horii, Xiumei Wang, Fabrizio Gelain, Shuguang Zhang, *Biological designer self-assembling peptide nanofiber scaffolds significantly enhance osteoblast proliferation, differentiation and 3-D migration*, PLoS ONE 2(2):e190.

[45] Zhenqing Li e Jianjun Guan, *Hydrogels for Cardiac Tissue Engineering*, Department of Materials Science and Engineering, The Ohio State University, Columbus.



# Sitografia

[1] <http://www.istat.it/it/archivio/4216>

[2] <http://webusers.fis.uniroma3.it/iucci/gio/Peptide.pdf>

[6] [http://mikyra.altervista.org/blog/tag/idrogel/?doing\\_wp\\_cron=1354886658](http://mikyra.altervista.org/blog/tag/idrogel/?doing_wp_cron=1354886658)

[14] <http://www.dottorlovisolo.com/2010/articolo.asp?dart=617>

[15] <http://www.bioblog.it/2006/03/16/ricrescita-del-nervo-ottico/200621>

[16] [http://it.wikipedia.org/wiki/Tessuto\\_cartilagineo](http://it.wikipedia.org/wiki/Tessuto_cartilagineo)

[19] <http://www.news-medical.net/health/Bone-Disease.aspx>

[28] <http://www.my-personaltrainer.it/cuore.htm>

[29] <http://www.anmco.it/periltuocuore/malattie/valvole.html#>

[31] <http://www.sciencedaily.com/releases/2013/02/130220153705.htm>

[46] <http://blogs.nature.com/spoonful/2013/02/injectablegel-repairs-damage-after-heart-attack-in-pigs.html>

[47] <http://www.italia-news.it/salute-c13>





# Elenco delle tabelle e delle figure

1. Tabella: Idrogeli utilizzati per la rigenerazione neurale
2. Tabella: Requisiti per le cellule e le matrici per rigenerazione tissutale cardiaca
  - 1.1 Figura: Struttura di un peptide auto-assemblante
  - 1.2 Figura: Struttura del monomero e del polimero di PVA
  - 1.3 Figura: Struttura del monomero e del polimero PVP
  - 2.1.1 Figura: Rappresentazione di un neurone
  - 2.1.2 Figura: Proprietà di uno scaffold ideale
  - 2.1.3 Figura: Processo di rigenerazione di un nervo lesionato nel SNC e nel SNP
  - 2.1.4 Figura: Formazione di sinapsi attive di ratto
  - 2.1.5 Figura: Nervo ottico lesionato e effetti sulla vista
  - 2.2.1 Figura: Cartilagine ialina
  - 2.2.2 Figura: Classificazione delle lesioni articolari
  - 2.2.3 Figura: Peptide auto-assemblante KLD-12
  - 2.3.1 Figura: Rappresentazione dell'osso dell'anca affetto da osteoporosi
  - 2.4.1 Figura: Il cuore
  - 2.4.2 Figura: Valvola cardiaca affetta da endocardite
  - 2.4.3 Figura: Rigenerazione del tessuto cardiaco di maiale infaruito
- 3.1 Figura: Rappresentazione del rilascio di farmaco da un gel
- 3.2 Figura: Rilascio controllato di farmaci con sistema a serbatoio e a matrice
- 3.3 Figura: Esempio di trattamento per via orale



# Ringraziamenti

*Ringrazio: la professoressa Monica Dettin per la professionalità, la disponibilità e la gentilezza costantemente dimostratemi.*

*Un ringraziamento speciale va ai miei genitori per il sostegno incondizionato, e per aver sempre creduto fermamente nelle mie capacità guidandomi e incoraggiandomi.*

*Ringrazio: mio fratello Simone e Linda, per il sostegno morale non solo nello studio ma anche nella vita; e Anna ed Emma perché sono semplicemente fantastiche.*

*Un ringraziamento particolare va ad Andrea che, da quando mi conosce, mi ha sempre supportata e sopportata in ogni mia scelta, facendomi capire che niente è insormontabile e che tutto diventa più bello se si fa con un sorriso.*

*Ringrazio in particolar modo Andrea per la bellissima amicizia maturata in questi anni universitari; Matteo e Mary, per aver contribuito a rendere questi anni di studio indimenticabili e meno faticosi.*

*Ringrazio tutti i “nemici” per avermi costantemente istigata a fissare nuovi obiettivi; e tutti gli amici che mi hanno sostenuta nel raggiungere nuovi traguardi.*