



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**



DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

“L'USO DEGLI IDROGEL NELLA MEDICINA RIGENERATIVA”

Relatore: Prof. Andrea Bagno

Laureanda: Lucrezia Gilli

ANNO ACCADEMICO 2022 – 2023

Data di laurea 28/09/2023

Indice

Abstract	pagina 4
Introduzione	pagina 5
Capitolo 1: Idrogel: classificazione e proprietà	pagina 6
1.1 Gli idrogel	pagina 6
1.2 Sintesi degli idrogel	pagina 8
1.3 Classificazione degli idrogel secondo lo stato fisico	pagina 10
1.4 Idrogel naturali	pagina 11
1.4.1 Idrogel naturali a base di proteine	pagina 13
1.4.2 Idrogel naturali a base di polisaccaridi	pagina 15
1.4.3 Idrogel naturali a base di tessuti decellularizzati	pagina 16
1.5 Idrogel sintetici	pagina 17
Capitolo 2: Trattamenti mediante l'uso di idrogel nella rigenerazione di tessuto cardiaco a seguito di infarto miocardico	pagina 19
2.1 Infarto miocardico: cure attraverso approcci tradizionali	pagina 19
2.2 Approcci per la rigenerazione cardiaca mediante l'uso di idrogel	pagina 21
2.2.1 Idrogel iniettabili	pagina 22
2.2.2 Patches cardiaci	pagina 23
2.2.3 Innesti vascolari e nanoparticelle	pagina 25
2.2.4 Confronto tra i diversi approcci nella rigenerazione cardiaca a seguito di IM	pagina 27
2.2.5 Idrogel intelligenti: rigenerazione del tessuto cardiaco	pagina 27
Capitolo 3: Applicazioni di idrogel nella rigenerazione del tessuto osseo e cartilagineo	pagina 30
3.1 Caratteristiche degli idrogel nell'ingegneria tissutale ossea	pagina 30
3.2 Applicazione clinica di idrogel a base di gelatina contenenti FGF-2 per la cura di osteonecrosi della testa femorale	pagina 33
3.3 Idrogel bifunzionale a base di alginato e chitosano usato in terapia contro il tumore osseo	pagina 35
3.4 Il ruolo degli idrogel nella rigenerazione della cartilagine articolare	pagina 38
3.5 Tecniche avanzate per la produzione di idrogel utilizzabili nel tessuto osteocondrale e cartilagineo	pagina 41

Capitolo 4: Applicazioni di idrogel per la rigenerazione del tessuto nervoso	pagina 43
4.1 Il ruolo degli idrogel conduttivi nella rigenerazione del tessuto nervoso	pagina 43
4.2 Applicazioni di idrogel nella riparazione delle lesioni al midollo spinale	pagina 45
4.2.1 Lesione al midollo spinale: trattamenti attuali	pagina 45
4.2.2 Idrogel per il trattamento di lesioni al midollo spinale	pagina 47
4.3 Applicazioni di idrogel nella riparazione delle lesioni ai nervi periferici	pagina 49
4.3.1 Lesione ai nervi periferici: principali approcci terapeutici	pagina 49
4.3.2 Idrogel contenenti cellule staminali o fattori di crescita nella rigenerazione dei nervi periferici	pagina 51
4.3.3 Idrogel conduttivi nella rigenerazione dei nervi periferici	pagina 52
4.3.4 Idrogel a base di peptidi autoassemblanti	pagina 53
Capitolo 5: Sfide e sviluppi futuri degli idrogel	pagina 55
Conclusioni	pagina 59
Bibliografia	pagina 61
Sitografia	pagina 66
Ringraziamenti	pagina 67

Abstract

La medicina rigenerativa è una nuova frontiera della medicina che si occupa di riparare, rigenerare e sostituire tessuti e organi danneggiati a seguito di malattie, traumi, difetti congeniti o invecchiamento. L'argomento trattato nella tesi è relativo all'uso degli idrogel nella medicina rigenerativa: vengono illustrate le potenzialità di questi biomateriali nel favorire la rigenerazione di tessuti biologici e organi.

Gli idrogel vengono ampiamente utilizzati nella medicina rigenerativa per via della loro versatilità: infatti è possibile applicare gli idrogel nella rigenerazione di numerosi tessuti biologici. Inoltre negli idrogel possono essere incorporati altri materiali in grado di aumentare le proprietà di interesse.

Nella prima parte della tesi è illustrata una panoramica sugli idrogel e sulle loro caratteristiche, proprietà, principali metodi di sintesi e classificazioni. La seconda parte della tesi è suddivisa in tre capitoli che trattano l'uso degli idrogel nella rigenerazione di tre tessuti: tessuto cardiaco, tessuto osseo e tessuto nervoso. Vengono descritte diverse condizioni di interesse clinico, a seguito di patologie o traumi, per le quali l'uso degli idrogel può favorire la rigenerazione tessutale. Nell'ultima parte della tesi sono introdotte le principali nuove frontiere per l'utilizzo degli idrogel: date le numerose proprietà vantaggiose dagli idrogel, si ricercano sempre nuove applicazioni per questi biomateriali.

Introduzione

L'incidenza sempre più alta di eventi che comportano la perdita di organi e tessuti accresce la necessità di sviluppare terapie che possano rigenerarli e quindi evitare la necessità di effettuare trapianti chirurgici. Il settore della medicina rigenerativa utilizza le tecniche dell'ingegneria tissutale per promuovere la rigenerazione di organi e tessuti lesionati.

A partire dal 1960, gli idrogel sono emersi come biomateriali adatti agli scopi dell'ingegneria tissutale: si presentano come materiali con un'alta percentuale di acqua al loro interno e possiedono proprietà meccaniche viscoelastiche. Gli idrogel vengono usati come scaffolds per trasportare nel sito lesionato cellule, farmaci, proteine e fattori di crescita. Gli idrogel possono essere sintetizzati a partire da materiali naturali o sintetici: l'utilizzo di materiali naturali comporta una maggiore biocompatibilità e biodegradabilità, invece l'uso di materiali sintetici garantisce maggiore resistenza meccanica. Possono essere realizzati anche idrogel utilizzando sia materiali naturali che sintetici per ottenere alte prestazioni a livello di biocompatibilità e di proprietà meccaniche.

Gli idrogel, grazie alla loro ampia varietà di formulazioni, come ad esempio, idrogel iniettabili, patches, micro-sfere, possono essere utilizzati in medicina rigenerativa in numerosi ambiti diventando possibili soluzioni che aprono la strada a nuovi approcci terapeutici.

Gli idrogel trovano ampio utilizzo per la rigenerazione di molti tessuti biologici, ad esempio, tessuto cardiaco, tessuto osseo, tessuto cartilagineo e tessuto nervoso. Nella rigenerazione di questi tessuti, gli idrogel agiscono sia come vettori, ma anche come matrici in grado di garantire sopravvivenza, proliferazione e migrazione cellulare. Inoltre, gli idrogel forniscono un ambiente adatto a preservare proteine, fattori di crescita ed enzimi.

Negli ultimi decenni nuove classi di idrogel sono state prodotte come, ad esempio, gli "idrogel intelligenti" in grado di rispondere a stimoli esterni cambiando la loro struttura, oppure gli "idrogel stereocomplessi autoassemblanti" capaci di autoassemblarsi una volta applicati in situ. La ricerca sugli idrogel è sempre in corso: nuove formulazioni di idrogel verranno prodotte sia in biomedicina che nel settore delle nanotecnologie. L'obiettivo in medicina rigenerativa sarà quello di creare idrogel ancora più adatti ad ospitare cellule e favorire la rigenerazione tissutale, mentre nel settore delle nanotecnologie si guarderà agli idrogel come possibili sensori biochimici.

Capitolo 1: Idrogel: classificazione e proprietà

1.1 Gli idrogel

Gli idrogel sono strutture polimeriche in grado di assorbire grandi quantità di acqua e di fluidi biologici. Le catene polimeriche sono interconnesse attraverso diversi tipi di legami chimici, come ad esempio legami covalenti, forze ioniche, legami a idrogeno [1,2].

La principale caratteristica degli idrogel è che non si dissolvono in acqua e per questo vengono ampiamente usati nella medicina rigenerativa poiché estendono questa loro proprietà anche ai fluidi biologici. Inoltre, gli idrogel hanno una struttura molto simile alla matrice extracellulare e sono biocompatibili.

Le prime ricerche sugli idrogel iniziarono nella seconda metà degli anni Trenta del 1900 principalmente in Germania, per arrivare al 1960 quando Wichterle e Lim produssero il pHEMA ovvero il primo idrogel sintetico ottenuto mediante polimerizzazione tra radicali liberi di 2-idrossietilmetacrilato in soluzione acquosa con etilenglicole-dimetilacrilato.

Nel corso degli anni sono state fornite diverse definizioni di idrogel, ma la più significativa è la seguente: *“gli idrogel sono strutture polimeriche interconnesse gonfie d’acqua, prodotti attraverso semplici reazioni che creano reticolazioni tra uno o più monomeri e polimeri”*.

Un’altra definizione è la seguente: *“materiali polimerici che esibiscono l’abilità di rigonfiarsi e di trattenere una grande quantità d’acqua nelle loro interconnessioni 3D e comunque non sono solubili in acqua”* [2,3].

Lo sviluppo degli idrogel si può riassumere in tre fasi principali [1,4]:

1. la ricerca partì dalla scoperta del pHEMA nel 1960 e successivamente del PVA e PEG e si pose l’obiettivo di creare nuovi materiali con buone proprietà meccaniche e rigonfianti, che permettessero il mantenimento della struttura e favorissero lo scambio di ossigeno con l’esterno poiché venivano principalmente usati nella creazione di lenti a contatto;
2. durante gli anni 70, le ricerche si concentrarono nel creare idrogel più innovativi; l’obiettivo era produrre idrogel che potessero modificarsi in risposta a stimoli esterni o all’ambiente nel quale venivano inseriti. Dovevano adattarsi a transizioni di temperatura, pH o ad una variazione della concentrazione di specifiche molecole presenti nell’ambiente esterno al materiale. Per via di queste nuove proprietà gli idrogel iniziarono ad essere usati in ambito biomedicale a scopo terapeutico;

3. negli anni 90 la produzione di idrogel si concentrò nel creare idrogel stereocomplessi autoassemblanti, ovvero materiali ottenuti con polimeri stereoregolari la cui formazione avveniva in situ a seguito dell'iniezione nel paziente.

Attualmente la ricerca è orientata verso la creazione di “idrogel intelligenti” ovvero materiali in grado di svolgere un ruolo attivo nel momento del loro inserimento in situ e quindi devono possedere l'abilità di poter modificare rigonfiamento, porosità e struttura in risposta a diversi stimoli. In questo modo è possibile adattarli a numerosi scopi e poterli usare nella rigenerazione tessutale.

L'abilità degli idrogel di assorbire acqua o fluidi biologici deriva dai gruppi funzionali idrofilici innestati sulla catena principale; la loro capacità di non dissolversi in acqua è dovuta alle reticolazioni presenti tra le catene macromolecolari. Le interazioni responsabili dell'assorbimento dell'acqua includono forze osmotiche e di idratazione, che dovendo essere bilanciate, attivano le forze coesive esercitate dalle catene polimeriche degli idrogel. Queste forze causano l'espansione delle catene caratteristiche degli idrogel provocando il loro tipico rigonfiamento; inoltre questo principio di opposizione di forze mantiene lo stato di equilibrio della struttura degli idrogel. Infatti, la loro caratteristica reticolazione li rende resistenti a sollecitazioni meccaniche, proprietà che garantisce l'integrità fisica degli idrogel.

Gli idrogel presentano un comportamento viscoelastico: la caratteristica di viscosità deriva dalla presenza nel materiale di una fase liquida, che scorre durante la deformazione; essendo viscoelastici questi materiali esibiscono proprietà meccaniche tempo-dipendenti. La resistenza meccanica degli idrogel è funzione della densità delle reticolazioni, tuttavia più resistente è il gel meno acqua può assorbire.

Ogni idrogel è caratterizzato in termini di: capacità di rigonfiamento, proprietà meccaniche, dimensione, bioattività, caratteristiche che dipendono anche dai metodi di preparazione. Il punto di forza degli idrogel è la loro versatilità grazie al fatto che si possono facilmente cambiare le proprietà fisiche e chimiche per adattarle ad una specifica applicazione.

Gli idrogel si classificano in naturali o sintetici in base ai materiali che li costituiscono. In ambito biomedicale spesso si creano idrogel ibridi, che comprendono sia materiali naturali che sintetici, per ottenere prestazioni migliori sia dal punto di vista biologico che meccanico. In particolare, gli idrogel usati nella medicina rigenerativa devono soddisfare diversi criteri di progettazione per simulare la matrice extracellulare (ECM) e quindi per promuovere la formazione di nuovi tessuti. Il primo requisito è avere una struttura 3D che imiti quella dei tessuti biologici e promuova la crescita cellulare. Inoltre questi biomateriali devono soddisfare sia requisiti meccanici e fisico-chimici come porosità, biodegradazione, corrette proprietà

chimiche superficiali, sia requisiti di natura biologica come la biocompatibilità, l'adesione cellulare e devono favorire l'angiogenesi.

La superficie degli idrogel è il sito primario di interazione con le cellule e i tessuti circostanti; le sue caratteristiche possono essere migliorate con l'aggiunta di fattori come ad esempio: peptidi RGD, fattori di crescita, fibronectina, che migliorano l'adesione e la proliferazione cellulare.

La presenza di vasi sanguigni è necessaria per avere apporto di nutrienti ed eliminazione di prodotti di scarto, tuttavia progettare idrogel che consentano la crescita di nuovi vasi sanguigni è una grande sfida. Ci sono due principali approcci nell'angiogenesi: il primo prevede che i fattori di crescita vasculogenici siano incorporati nella struttura degli idrogel, il secondo invece consiste nell'inserimento all'interno degli idrogel di alcune cellule endoteliali. Il primo metodo è quello preferibile in quanto con il secondo le cellule endoteliali inserite potrebbero incorrere nella necrosi in attesa della crescita vascolare.

Durante la realizzazione di questi materiali è importante anche considerare il costo di produzione, poiché è necessario creare un prodotto che possa essere accessibile economicamente in modo da poterlo implementare e utilizzare ampiamente.

1.2 Sintesi degli idrogel

Gli idrogel sono sintetizzati a partire da monomeri o polimeri idrofilici al fine di formare una rete in grado di assorbire l'acqua. Come detto, la sintesi può avvenire partendo da polimeri naturali o sintetici. Successivamente, dopo la creazione del polimero di interesse, attraverso la reazione di gelificazione il polimero passa allo stato fisico di gel. La sintesi degli idrogel avviene principalmente attraverso due processi diversi: reticolazione chimica e reticolazione fisica. Gli idrogel creati per reticolazione chimica sono prodotti in due modi diversi: polimerizzazione 3D attraverso la creazione di legami covalenti o mediante la formazione di un reticolo diretto tra polimeri solubili in acqua: in questo caso si creano fisicamente le reticolazioni. Negli idrogel chimici, le catene polimeriche sono connesse attraverso legami covalenti forti che permettono al materiale di conservare la sua struttura; inoltre presentano migliore stabilità meccanica, chimica e termica rispetto agli idrogel ottenuti per reticolazione fisica.

Nella polimerizzazione 3D un monomero idrofilico viene fatto polimerizzare in presenza di un agente di reticolazione bifunzionale. La polimerizzazione è avviata da composti che generano radicali liberi, come ad esempio perossido di benzoile, 2,2-azobisisobutironitrile, perossidissolfato di ammonio; si ha quindi la creazione di radicali liberi che, avviando il processo

di polimerizzazione, formano il polimero di interesse. Le reazioni tra radicali possono portare velocemente alla formazione di una rete tridimensionale. Il processo di polimerizzazione può anche essere attivato attraverso radiazione: raggi UV, raggi gamma, fasci di elettroni. La polimerizzazione 3D è quindi la reazione tra monomeri idrofilici bifunzionali, che presentano gruppi reattivi terminali come -OH, -NH₂, -COOH. Un limite di questa tecnica è dovuto alla presenza di possibili residui di monomeri non reagiti che possono essere tossici: è quindi necessario eliminarli tramite l'estrazione d'acqua in eccesso, operazione che può richiedere fino a diverse settimane. Per ovviare a questa lunga attesa si può effettuare un'ulteriore polimerizzazione a seguito della polimerizzazione tridimensionale attraverso trattamento termico o irradiazione. In alternativa, si possono usare monomeri non tossici come ad esempio polietilenglicole dimetacrilato [5]. Le principali fasi della polimerizzazione 3D sono illustrate nella Figura 1.1.

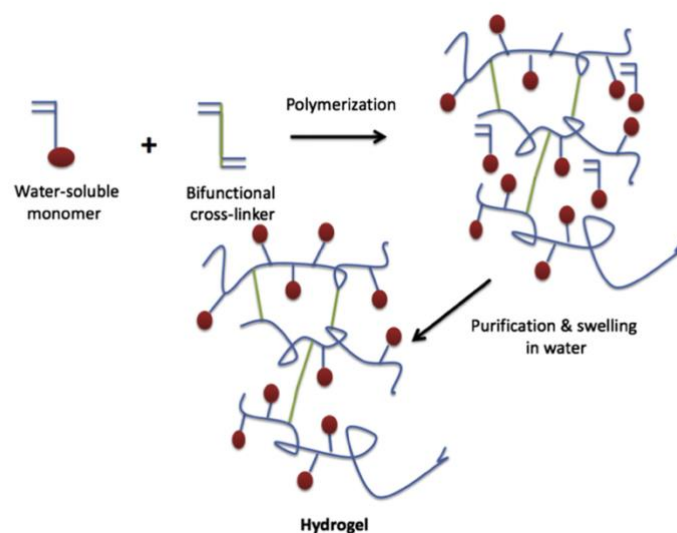


Figura 1.1: polimerizzazione 3D degli idrogel. Un monomero idrofilico viene fatto polimerizzare in presenza di un agente di reticolazione bifunzionale. Successivamente avviene la purificazione e la gelificazione e si ottiene l'idrogel

Il secondo metodo di sintesi attraverso reticolazione chimica degli idrogel è dovuto alla formazione di un reticolo diretto tra polimeri solubili in acqua e in questo caso non è necessaria la fase di purificazione. Esempi di polimeri solubili in acqua sono: acido poliacrilico, alcool polivinilico, glicole polietilenico e molti polisaccaridi. Questi polimeri non necessitano della rimozione dei residui perché non sono tossici. Le radiazioni causano la formazione delle reticolazioni e quindi favoriscono la formazione del reticolo (Figura 1.2): inoltre permettono la sua sterilizzazione.

Un'ulteriore tecnica più recente consiste nel miscelare assieme a temperatura ambiente i polimeri solubili: il processo di reticolazione si ottiene successivamente mediante trattamento ad alta pressione o radiazione a microonde [5].

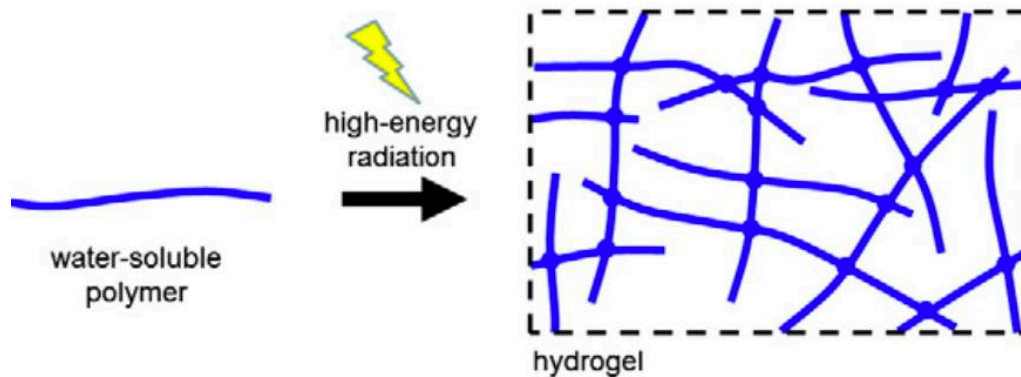


Figura 1.2: sintesi di idrogel attraverso polimeri in soluzione ottenuta tramite radiazione.

Gli idrogel ottenuti per reticolazione fisica sono caratterizzati dalla presenza di legami a idrogeno, interazioni di van der Waals, entanglements. La presenza di questi legami li rende facilmente solubili e quindi non riescono a mantenere una loro integrità strutturale. Per realizzare questi legami si utilizzano radiazioni come ad esempio raggi UV o γ . La sintesi attraverso l'uso dei raggi γ non è molto sviluppata poiché richiede la presenza di atmosfera inerte, apparecchiature costose e inoltre può comportare rischi per l'operatore. Per questi motivi si usano maggiormente i raggi UV.

1.3 Classificazione degli idrogel secondo lo stato fisico

Le principali proprietà degli idrogel sono date dalla loro struttura tridimensionale, in ambito biomedicale le più interessanti sono il loro rigonfiamento e la loro caratteristica capacità di favorire il trasporto di massa per diffusione. Questi biomateriali vengono usati in numerosi ambiti e proprio per questo sono presenti in molte composizioni chimiche diverse, dalle quali poi derivano le diverse proprietà. Di norma gli idrogel vengono classificati in tre categorie a seconda dello stato fisico: idrogel solidi, idrogel semisolidi e idrogel liquidi.

Gli idrogel solidi riescono ad imitare l'architettura dei diversi tessuti biologici e creare un microambiente ottimale per la proliferazione cellulare.

Questi materiali sono caratterizzati da legami forti, come quello ionico e covalente, a temperatura ambiente si presentano solidi ma poi possono rigonfiarsi in acqua, fluidi biologici o soluzioni tampone. L'obiettivo di questi idrogel è quello di avere proprietà fisiche, chimiche

e biologiche simili a quelle della maggior parte dei tessuti biologici. Per ottenere migliori funzionalità, è possibile incorporare nanoparticelle di materiali inorganici, principalmente metallici e ceramici, con cui funzionalizzare questi biomateriali aggiungendo importanti proprietà elettriche e magnetiche, oltre a rendere gli idrogel molto più resistenti alle sollecitazioni esterne. Un esempio sono gli idrogel a base di ossido di grafene che, grazie alla presenza di questo composto, hanno un miglioramento nelle proprietà meccaniche con un aumento di densità delle reticolazioni intercatena. Oppure si possono aggiungere elementi e composti come argento, oro, ossido di zinco, per ottenere idrogel usati come scaffolds per curare le lesioni cutanee poiché questi materiali svolgono azione antimicrobica [2,4,5].

Gli idrogel semisolidi hanno una forte interazione adesiva tra la loro interfaccia e i tessuti molli grazie alla presenza di legami a idrogeno e forze di van der Waals. Per via delle loro proprietà bioadesive, vengono spesso definiti idrogel bioadesivi o idrogel muco-adesivi. Questa forte adesione può essere usata per il rilascio controllato di farmaci in situ. In questi idrogel sono presenti due tipi di materiali: uno deve essere di natura biologica, l'altro può essere di natura biologica o sintetica, ma entrambi devono essere ad alto peso molecolare in quanto questo migliora le proprietà adesive.

Gli idrogel liquidi si presentano liquidi a temperatura ambiente ma in presenza di una particolare temperatura hanno un'elasticità simile ai tessuti molli. Per la loro facilità di sintesi sono ampiamente usati in numerose applicazioni biomedicali, come ad esempio, il rilascio controllato di farmaci o la rigenerazione tissutale. La principale proprietà di questi idrogel è quella di poter incorporare una grande varietà di altri materiali organici, inorganici, farmaci, proteine o cellule. Inoltre possono essere applicati in situ utilizzando la via dell'iniezione poiché possiedono proprietà altamente idrofiliche che favoriscono questa somministrazione. Questi idrogel sono molto utili nella medicina rigenerativa in virtù della loro biodegradazione e biocompatibilità; inoltre, dato il loro stato liquido, sono funzionali nel consentire al loro interno sia il flusso di nutrienti che quello dei prodotti di scarto.

1.4 Idrogel naturali

La ricerca nel settore della medicina rigenerativa si è concentrata sugli idrogel derivati dai materiali biologici, in particolare da proteine come collagene, elastina, oppure da polisaccaridi come glicosamminoglicani o alginato. Gli idrogel naturali includono anche acido ialuronico, chitosano e idrogel derivati da tessuti decellularizzati. Gli idrogel naturali hanno importanti proprietà: biocompatibilità, biodegradabilità, bassa citotossicità, la possibilità di rendere l'idrogel compatibile con l'ambiente biologico. Questi idrogel hanno però scarse proprietà

meccaniche e per questo motivo vengono spesso combinati con idrogel sintetici creando materiali compositi.

La sintesi degli idrogel naturali avviene principalmente attraverso il processo di reticolazione fisica per riuscire ad ottenere delle reticolazioni in grado di assorbire acqua. Queste sintesi si realizzano modificando opportunamente la temperatura a cui si trovano i precursori in modo da rompere i loro legami e quindi favorire successivamente la formazione di nuovi legami per creare il polimero di interesse. Dopo la formazione del polimero segue la fase di gelificazione per ottenere l'idrogel.

Gli idrogel naturali hanno altre eccellenti proprietà come la biostabilità e la possibilità di essere digeribili nelle reazioni enzimatiche. Infatti vengono considerati “ecologici” proprio perché provengono da fonti naturali, rinnovabili, non tossiche e biodegradabili: questa somma di caratteristiche li rende più sicuri nell'evitare reazioni indesiderate.

Gli idrogel naturali possono essere classificati in 3 gruppi: materiali a base di proteine, materiali a base di polisaccaridi, materiali derivati da tessuto decellularizzato (Figura 1.3). Generalmente sono formati dai componenti tipici dell'ECM e per questo riescono ad imitare la struttura e l'elasticità tipici della matrice extracellulare; inoltre, essi risultano biocompatibili e bioattivi. Il loro limite principale è che essendo simili ai tessuti molli presentano limiti a livello meccanico.

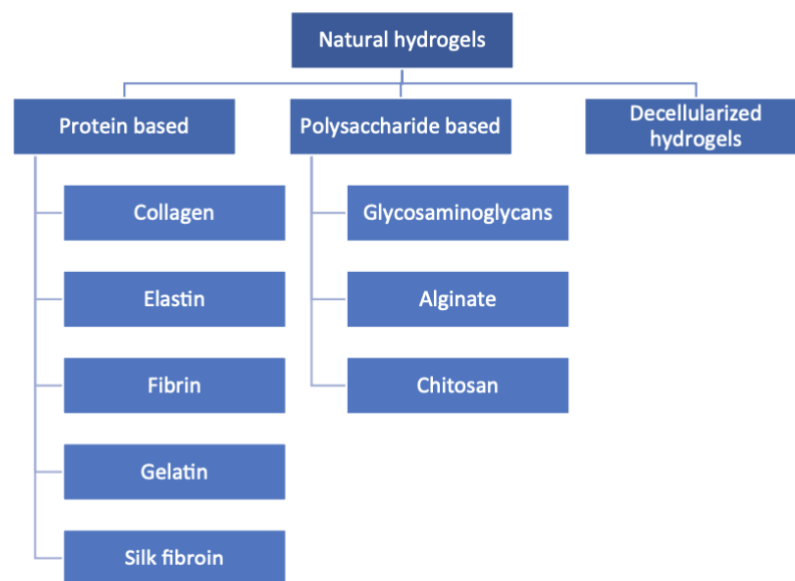


Figura 1.3: classificazione degli idrogel naturali.

1.4.1 Idrogel naturali a base di proteine

Gli idrogel naturali a base di proteine sono sintetizzati a partire da: collagene, elastina, fibrina, gelatina e fibroina della seta. Alcune di queste proteine si trovano principalmente nell'ECM, altre sono prodotte da altri organismi viventi come ad esempio il baco da seta. Queste proteine rivestono un ruolo importante negli idrogel perché conferiscono a questi materiali la caratteristica di essere biocompatibili e di mimare strutture che sono già presenti in natura. Si riporta una descrizione degli idrogel sviluppati a partire da queste proteine.

Il collagene è la principale proteina della ECM, è uno dei principali costituenti di tendini e legamenti il cui ruolo è quello di fornire supporto meccanico alle articolazioni al fine di resistere ad un'eventuale deformazione plastica ripetitiva e svolgere una funzione di collegamento tra tessuti. Il collagene è uno dei principali costituenti dei tessuti molli che supportano la cute e gli organi interni, ma è anche presente nella matrice trasparente della cornea. Il collagene se riscaldato perde completamente la sua struttura: si forma una massa denaturata che durante il raffreddamento è in grado di assorbire grandi quantità d'acqua trasformandosi in gelatina. Esistono diversi tipi di collagene ma il collagene di tipo I è tipicamente il più usato per la creazione di biomateriali: però in questi materiali le proprietà meccaniche sono insufficienti a causa della mancanza di legami covalenti crociati. Per risolvere questo problema, si cerca di creare ulteriori legami covalenti che garantiscono buone proprietà meccaniche usando processi di reticolazione chimica. Gli idrogel a base di collagene presentano bassa risposta infiammatoria, biocompatibilità, biodegradabilità. Durante la sintesi degli idrogel a base di collagene di tipo I viene solitamente aggiunto NaCl nella soluzione per ottenere migliori prestazioni meccaniche; inoltre, se durante la sintesi viene aumentato il pH fino ad arrivare al punto isoelettrico del polimero, si può ottenere un miglioramento delle proprietà viscoelastiche. Per ottenere una maggiore biocompatibilità, è possibile prima della gelificazione aggiungere cellule specifiche del tessuto di interesse al materiale. In alcune strutture come i nervi l'allineamento delle fibre di collagene è importante, per questo nella sintesi degli idrogel sono state utilizzate cellule epiteliali e nanoparticelle magnetiche che, inserite all'interno del materiale e sottoposte ad un campo magnetico esterno, riescono a dirigere l'orientamento delle fibre di collagene nel materiale. Il limite più grande per il collagene è di essere trombogenco e quindi di attivare processo di coagulazione. Inoltre il collagene puro, che solitamente viene estratto dal tessuto suino, è un materiale ad alto costo e quindi difficile da utilizzare ampiamente [6].

L'elastina è un'importante proteina fibrosa presente in grandi quantità nei tessuti molli; è insolubile grazie alla presenza prevalente di amminoacidi idrofobici. Le reticolazioni

intercatena derivano dal suo precursore solubile ovvero la tropoelastina. La sua principale funzione è fornire elasticità ai tessuti; essendo componente naturale dell'ECM, include altre proprietà come la biocompatibilità e la biodegradabilità. Grazie alla sua proprietà di elasticità, l'elastina è stata usata nella costruzione di matrici per innesti vascolari a cui serve una elevata capacità di adattamento in risposta ai carichi ciclici dovuti all'attività cardiaca. Tuttavia, anche se in alcuni casi l'elastina è presente negli idrogel, solitamente non viene molto usata perché dovrebbe essere purificata dalle fibre che si formano durante la sua sintesi e durante questo processo potrebbero avvenire contaminazioni che portano a risposte indesiderate all'interno del corpo; inoltre l'elastina tende a calcificare. Poiché l'elastina è insolubile, molte volte nella produzione di idrogel vengono usate le sue forme solubili come la tropoelastina. Nonostante i limiti dell'elastina, viene aggiunta negli idrogel quando serve una buona elasticità e molte volte viene usata per creare supporti insieme ad altre proteine come il collagene; infatti i gel di collagene-elastina sono molto usati per la guarigione di lesioni cutanee.

Il fibrinogeno è la forma inattiva della fibrina e quando questa proteina viene attivata, svolge un ruolo importante nella riparazione dei tessuti e nella coagulazione: un gel ricco di coaguli di fibrina fornisce un supporto nel processo di guarigione delle lesioni cutanee. Si può ottenere il fibrinogeno direttamente dal sangue limitando i rischi di incompatibilità immunologica, infatti gli idrogel a base di fibrina vengono considerati un'alternativa ai gel di collagene, perché in questo modo si ottiene un materiale a basso costo e biocompatibile. Questi idrogel vengono principalmente usati nei tessuti cardiaci, però questi materiali presentano bassa resistenza meccanica che non è compatibile con i cicli di contrazione cardiaci; in questi casi per risolvere il problema si aggiungono microfilamenti di materiali con elevate prestazioni meccaniche in un gel di fibrina: questo allineamento conferisce un aumento significativo delle proprietà meccaniche. Solitamente si combinano queste matrici con altri materiali per mimare il tessuto di interesse oppure si aggiungono materiali per proteggere l'idrogel stesso, ad esempio insieme alla fibrina si possono aggiungere gli inibitori della proteinasi che prevengono la degradazione della matrice di fibrina stessa. Una ulteriore tecnica consiste nell'uso di uno spray attraverso il quale si deposita un materiale a base di poliuretani stratificati, che contiene fattori di crescita, sulla fibrina: in questo modo è possibile ottenere un idrogel con buone proprietà meccaniche e bioattivo.

La gelatina è un polimero a bassa immunogenicità, basso costo, alta degradabilità e presenta proprietà gelformanti, addensanti, emulsionanti e schiumogene. Come detto, si ottiene dalla denaturazione della tripla elica del collagene ed esistono due tipi di gelatina derivata da due diversi trattamenti: se si lavora a pH acidi si ottiene la gelatina A, mentre se si lavora con

soluzioni alcaline si ottiene la gelatina B. La gelatina viene anche usata come agente di rivestimento per migliorare l'adesione cellulare per la rigenerazione dei tessuti, in particolare viene usata a contatto con il tessuto cardiaco. Per creare gli scaffolds a base di gelatina viene usata generalmente la gelatina A perché è preferibile per la costruzione delle strutture di interesse. La gelatina consente la possibilità di innestare sulla sua catena principale un'ampia varietà di polimeri sintetici in modo da creare un idrogel ibrido. Gli idrogel a base di gelatina sono impiegati nella somministrazione di molecole terapeutiche, infatti usando processi di elettrofilatura si riesce ad ottenere un materiale a base di gelatina che presenta una struttura simile a quella dell'ECM.

La fibroina della seta viene prodotta principalmente dai bachi da seta ma può essere prodotta anche da ragni: è ricca di glicina, alanina e serina. Per disgregare le fibre della fibroina di seta si deve inizialmente rimuovere la sericina, una proteina che unisce le fibre di seta, poi si utilizzano diversi solventi come ad esempio il bromuro di litio, acido formico, per separare le diverse fibre. La fibroina della seta ha eccellenti proprietà meccaniche, bassa reazione immunitaria, minima trombogenicità e tassi di degradazione accettabili. Un uso frequente della fibroina della seta è in combinazione con altri biopolimeri, come la gelatina, per ottenere bio-inchiostri impiegati nella produzione di tessuti usando il bioprinting 3D.

1.4.2 Idrogel naturali a base di polisaccaridi

I GAGs sono una classe di polimeri lineari costituiti dalla ripetizione di monomeri formati da due unità di natura glucidica, sono importanti nella composizione e nella struttura dell'ECM. Un esempio di GAGs è l'acido ialuronico che è presente nel tessuto connettivo umano ed è biodegradabile, idrofilico e possiede la capacità di essere assorbito durante molti processi metabolici. L'acido ialuronico può legare grandi quantità di acqua per formare legami a idrogeno con il solvente in cui è immerso, caratteristica fondamentale per un creare un idrogel. L'acido ialuronico è coinvolto nell'angiogenesi, nella guarigione delle ferite; i suoi derivati sono inseriti all'interno di materiali sia per permettere la crescita dei condrociti nella rigenerazione di tessuto osseo, ma anche per trattare malattie vascolari per via della loro biocompatibilità e proprietà antinfiammatorie.

L'alginato è un polisaccaride presente nelle capsule delle cellule batteriche e in alcune alghe, è formato da blocchi di β -D-mannuronato e α -L-glucuronato e le sue proprietà meccaniche sono correlate alla disposizione dei vari blocchi. L'alginato possiede proprietà non tossiche e non infiammatorie ma purtroppo presenta scarsa adesione cellulare e bassa resistenza meccanica. I gel di alginato vengono impiantati in tessuti differenti come tessuto nervoso, cardiaco, osseo.

Il chitosano è un polisaccaride costituito da β -(1-4)-D-glucosammina legata a N-acetil-D-glucosammina ed è ottenuto principalmente deacetilando la chitina; strutturalmente è simile ai GAGs contenuti nell'ECM. Gli idrogel di chitosano sono importanti perché hanno un basso costo, proprietà antibatteriche e la loro degradazione può essere controllata tramite la deacetilazione; per questo vengono ampiamente usati come sistemi di somministrazione di farmaci. Però questi gel sono influenzabili dal pH e dalla temperatura e non hanno elevate proprietà meccaniche; questo problema si risolve creando ulteriori legami intercatena o inserendo in questi gel anche la gelatina. Nella rigenerazione di tessuto osseo per compensare alla mancanza di resistenza meccanica si inseriscono alginato o acido ialuronico per ottenere prestazioni superiori.

1.4.3 Idrogel naturali a base di tessuti decellularizzati

Un tessuto decellularizzato è un tessuto che contiene soltanto l'impalcatura dell'ECM poiché sono state tolte tutte le componenti cellulari per evitare una risposta immunologica da parte del paziente; in questo modo si riesce ad avere un ambiente ottimale per una futura crescita cellulare, poiché le cellule riconoscono le diverse proteine dell'ECM. Per avere queste matrici bisogna porre attenzione agli agenti utilizzati per crearle poiché potrebbero influenzare la struttura dell'ECM modificandola in modo permanente. Il metodo di decellularizzazione deve essere scelto in base al tessuto o organo da trattare, prestando molta attenzione ad aspetti quali la densità, la forma, lo spessore. La scelta di un metodo di decellularizzazione ottimale è la fase più importante per il successo o fallimento clinico. Nella decellularizzazione dei tessuti molli è importante la conservazione di elastina, collagene e GAGs poiché è fondamentale mantenere una matrice capace di indurre l'adesione, la proliferazione e la successiva migrazione cellulare. Il vantaggio di usare questo tipo di matrici è che queste conservano i fattori di crescita, molecole proteiche che promuovono le funzioni cellulari senza la necessità di funzionalizzare l'idrogel. Per creare idrogel ottenuti da tessuti decellularizzati inizialmente si procede con la riduzione del materiale secco in piccoli pezzi e successivamente i pezzi vengono digeriti con la collagenasi o pepsina a intervalli di tempo diversi, che variano in base al tipo di tessuto decellularizzato; questo porta alla formazione di un biopolimero solubile in acqua a basso peso molecolare in cui viene lasciata la concentrazione desiderata della matrice diluendo opportunamente il pregel prima della fase di gelificazione.

1.5 Idrogel sintetici

Gli idrogel sintetici sono creati a partire da una vasta tipologia di monomeri e un'ampia possibilità di indurre diversi tipi di reticolazioni intercatena, in modo da creare un prodotto con proprietà fisiche o chimiche specifiche. Gli idrogel sintetici si possono ottenere con vari processi di sintesi, che possono comprendere sia la polimerizzazione radicalica sia la formazione spontanea di legami in soluzione acquosa. La creazione di idrogel sintetici permette di inglobare in un unico materiale più caratteristiche, che un idrogel naturale da solo non può possedere.

I principali idrogel sintetici sono pHEMA, alcool polivinilico (PVA) e glicole etilenico (PEG). Questi materiali sono i primi idrogel sintetici, a partire dai quali la ricerca si è concentrata nel creare idrogel in grado di rispondere ad un particolare pH o temperatura cambiando rapidamente l'entità del rigonfiamento e la porosità.

L'PHEMA è stato prodotto da Wichterle e Lim nel 1960 mediante polimerizzazione tra radicali liberi di idrossietilmetacrilato (HEMA) in soluzione acquosa con etilenglicole-dimetacrilato (EGDMA); è uno degli idrogel più utilizzati e presenta molteplici reticolazioni. È inerte durante i normali processi biologici, possiede una grande stabilità idrolitica, non viene assorbito attraverso i processi metabolici ed è biocompatibile. I primi idrogel PHEMA venivano usati per la produzione di lenti a contatto, quindi possedevano una struttura di rete omogenea. Questi materiali venivano prodotti attraverso sintesi in soluzione acquosa; tuttavia questo processo portava alla formazione di una rete di pori relativamente piccola, che non permetteva il trasporto attraverso il materiale di composti ad alto peso molecolare. Per aumentare le dimensioni dei pori è stata proposta una tecnica definita "congelamento-scongelo" in cui l'HEMA viene polimerizzato attorno a cristalli di ghiaccio che successivamente vengono sciolti: in questo modo si verificava un aumento della dimensione dei pori nella struttura idrofila dell'PHEMA. La principale caratteristica del PVA è di essere un polimero sintetico, lineare, biocompatibile e biodegradabile. Esistono due metodi principali di preparazione: nel primo, le catene di PVA sono legate usando glutaraldeide; nel secondo metodo, gli idrogel vengono preparati esponendo soluzioni acquose di PVA a cicli di congelamento e scongelamento ripetuti: questo favorisce la formazione di cristalli e consente la formazione di reticolazioni intercatena; inoltre, questo metodo è più sicuro perché non sono presenti agenti potenzialmente tossici. In molti casi il PVA è combinato con l'eparina che ha un'attività anticoagulante e questi idrogel sono stati usati nella rigenerazione del tessuto cardiaco.

Il PEG è costituito da catene polimeriche che, grazie ai loro gruppi terminali, conferiscono una natura glicolica al materiale. Esistono tre tecniche principali per la preparazione di reti PEG:

formazione chimica di reticoli tra catene di PEG, reazione di PEG bifunzionali e agenti che favoriscono la formazione di legami covalenti, formazione attraverso l'utilizzo di radiazioni. Principalmente il PEG viene prodotto attraverso la creazione di legami covalenti in soluzione acquosa. Il PEG viene spesso associato all'acido polilattico (PLA) per formare un complesso a blocchi A-B-A dove un blocco è idrofilico e l'altro blocco è idrofobico. Questa sequenza di blocchi porta alla formazione di un idrogel basato su interazioni idrofobiche, dove PEG è il blocco idrofilico mentre il PLA è il blocco idrofobico; questi tipi di idrogel si degradano in metaboliti endogeni producendo acido lattico e glicolico facilmente eliminabili dall'organismo.

Capitolo 2: Trattamenti mediante l'uso di idrogel nella rigenerazione di tessuto cardiaco a seguito di infarto miocardico

2.1 Infarto miocardico: cure attraverso approcci tradizionali

Durante il 2019 i disturbi cardiovascolari hanno causato la morte di 17.9 milioni di persone nel mondo e l'85% di queste morti è dovuta ad un'insufficienza cardiaca [7]. L'infarto miocardico (IM) è una condizione patologica che comporta la presenza di una ostruzione nelle arterie coronarie, che forniscono sangue al cuore: si determina una diminuzione dell'apporto di ossigeno al tessuto cardiaco che può provocare la necrosi del tessuto stesso. I sintomi principali sono la presenza di dolore toracico, difficoltà nella respirazione, sudorazione anomala, nausea; in alcuni casi è possibile che non ci siano sintomi osservabili e l'infarto miocardico viene definito "attacco di cuore silenzioso" [7].

Le principali cause del IM includono ipertensione e malattia coronarica, due condizioni che solitamente coesistono; altre cause sono dovute a: diabete, obesità, sindrome metabolica, stile di vita sedentario. L'infarto miocardico provoca la morte di numerosi cardiomiociti, interruzione del segnale elettrico cardiaco, diminuzione della funzione sistolica e diastolica portando infine ad un'insufficienza cardiaca. In una condizione di insufficienza cardiaca il muscolo cardiaco non è in grado di pompare in modo efficiente il sangue al resto del corpo. A seguito dell'infarto miocardico si sviluppa un rimodellamento cardiaco patologico: questo inizia poche ore dopo l'infarto e comporta un cambiamento cellulare e molecolare nel miocardio che causa una modifica delle dimensioni, massa e funzione del muscolo cardiaco stesso. Questi cambiamenti attivano i processi biochimici intercellulari portando a dilatazione, ipertrofia e formazione di cicatrici nel cuore. A seguito della necrosi dei cardiomiociti, i neutrofili, monociti e macrofagi migrano nella zona dell'infarto generando citochine che causano una locale infiammazione. Inoltre, i neutrofili rilasciano metalloproteinasi le quali attivate dalla serina, successivamente causano la degradazione del collagene che comporta una dilatazione ventricolare, un assottigliamento della parete miocardica e un aumento dello stress meccanico subito dalle pareti cardiache. L'aumento dello stress meccanico provoca poi un'ulteriore dilatazione delle pareti e formazione di cicatrici: tutto questo porta ad un'insufficienza cardiaca.

Per bloccare il processo di rimodellamento patologico occorre procedere con una terapia volta alla rigenerazione cardiaca che deve essere effettuata entro le prime settimane dall'IM.

Attualmente le terapie usate nella cura dell'IM si concentrano sulla rimozione della ostruzione e il ripristino del flusso sanguigno nell'arteria e comprendono sia cure farmacologiche che trattamenti chirurgici invasivi [7,8,9].

L'approccio farmacologico consiste nella somministrazione di farmaci trombolitici, anticoagulanti e inibitori dell'aggregazione piastrinica. Questi farmaci bloccano e sciolgono il trombo o placca e ne prevengono anche la formazione futura; il limite principale è il tempo: questi farmaci dovrebbero essere somministrati il prima possibile dopo l'avvenuto infarto miocardico, un leggero ritardo potrebbe provocare danni irreversibili al muscolo cardiaco. Inoltre nessun farmaco disponibile può eliminare la perdita di cardiomiociti per cancellare la compromissione causata da IM.

Nel caso di metodologie chirurgiche, un possibile approccio consiste nell'angioplastica, la quale permette di rimuovere l'ostruzione e/o liberare la coronaria ristretta. Originariamente questa tecnica prevedeva l'angioplastica a palloncino, poi negli anni è diventato sempre più frequente l'uso di stent. In entrambi i casi gli interventi avvengono al momento di arrivo del paziente nell'ospedale e si avvalgono anche dell'uso di farmaci; nel caso degli stent, i farmaci possono essere incorporati anche negli stent stessi, per prevenire la formazione di nuovi trombi. Un'ulteriore soluzione chirurgica consiste nel bypass coronarico: questo intervento porta al ripristino del normale flusso sanguigno creando un percorso alternativo intorno all'arteria coronarica bloccata. Il nuovo percorso viene costruito prelevando vasi sanguigni endogeni, come ad esempio l'arteria mammaria interna sinistra, per evitare reazioni avverse. Nella Figura 2.1 sono schematizzati i tradizionali approcci nella cura dell'infarto miocardico.

Nonostante sia le terapie farmacologiche che chirurgiche abbiano portato una notevole riduzione della mortalità dovuta a IM, rimane comunque un'alta mortalità ospedaliera. La motivazione principale è l'inefficienza delle terapie attuali nel limitare il rimodellamento cardiaco patologico che provoca una perdita di cardiomiociti, grave infiammazione e successivamente può portare anche alla morte. Infatti, il cuore mammifero è incapace di produrre una risposta rigenerativa: in seguito a IM si viene a formare una cicatrice nel sito della lesione.

Ulteriori tentativi tradizionali di cura sono dati dalla terapia cellulare e dalla terapia basata sulle vescicole extracellulari (EV), che sono state usate per ottenere la rigenerazione dei tessuti cardiaci danneggiati. Nella terapia cellulare vengono principalmente usate cellule staminali mesenchimali e cellule staminali cardiache; il problema della terapia cellulare è la bassa sopravvivenza cellulare una volta avvenuto l'inserimento in situ. La terapia basata sull'uso di

vescicole extracellulari presenta il problema della resistenza alla colonizzazione e dell'elevata clearance presente all'interno del tessuto cardiaco.

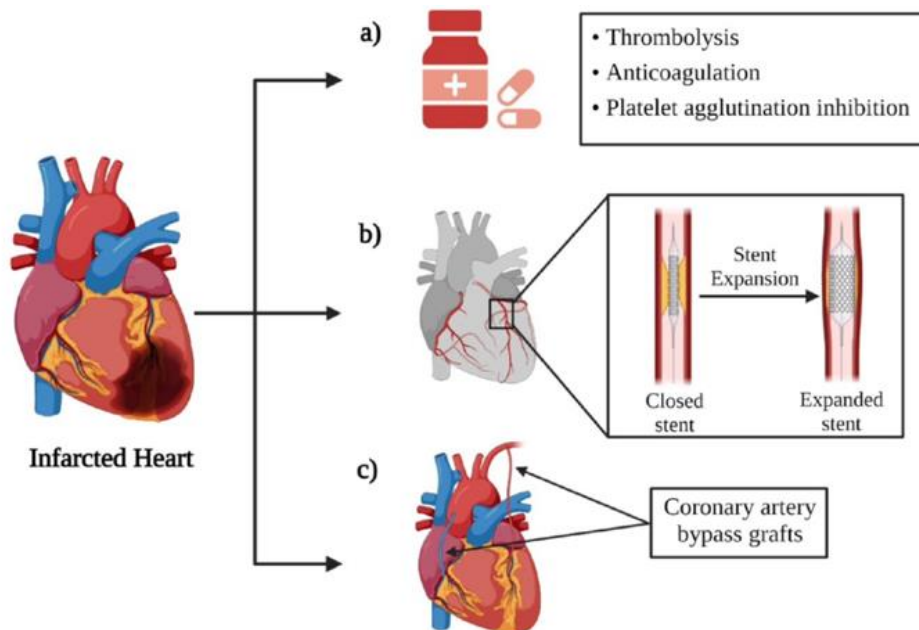


Figura 2.1: schema rappresentativo dei tre principali approcci tradizionali nella cura di IM: a) terapie farmacologiche mediante l'uso di farmaci trombolitici, anticoagulanti e inibitori dell'aggregazione piastrinica, b) intervento di angioplastica mediante l'uso di stent, c) bypass coronarico.

In questo contesto di terapie tradizionali si fanno spazio gli idrogel che possono essere usati per incapsulare cellule e biomolecole e garantire un microambiente adatto per la sopravvivenza cellulare, la quale porterà alla rigenerazione tessutale.

2.2 Approcci per la rigenerazione cardiaca mediante l'uso di idrogel

L'ingegneria tessutale applicata al tessuto cardiaco è un processo integrato che coinvolge sia le cellule (come i cardiomiociti e le cellule staminali) sia le matrici di supporto [10]. Per via della loro viscoelasticità e similitudine con i tessuti biologici, gli idrogel sono usati come matrici di supporto nella rigenerazione tessutale cardiaca a seguito di IM.

Il miocardio è un tessuto muscolare spesso in grado di sopportare contrazioni ripetute, rilassamenti e conduzioni elettriche del cuore. Gli idrogel, grazie alla loro viscoelasticità, riescono a sopportare i numerosi stress meccanici presenti all'interno del tessuto cardiaco. Inoltre, l'approccio attraverso l'uso degli idrogel mira a limitare l'espansione della cicatrice a seguito dell'IM, ridurre l'infiammazione, limitare la morte dei cardiomiociti, incrementare la proliferazione e crescita cellulare e indurre l'angiogenesi. È necessario promuovere questi aspetti poiché l'insufficienza cardiaca cronica può provocare la morte velocemente.

Gli idrogel sono materiali ideali nella produzione di matrici di supporto e sistemi di rilascio di sostanze poiché forniscono il giusto supporto meccanico al tessuto cardiaco danneggiato garantendo comunque i requisiti di biocompatibilità. Gli idrogel spesso vengono associati a terapie cellulari o biomolecole. Infatti, usando idrogel insieme a cellule staminali derivate dal midollo osseo, si ottiene un miglioramento nell'angiogenesi e si impedisce l'espansione della cicatrice. In alcuni casi gli idrogel vengono accoppiati con cellule staminali mesenchimali ottenute da vari tessuti tra cui il midollo osseo e il tessuto adiposo, svolgono la funzione di preservare l'integrità e la funzione dei tessuti dopo IM [11]. Le cellule staminali embrionali e le cellule staminali pluripotenti sono in grado di differenziarsi in cardiomiociti: queste cellule rappresentano una potenziale fonte cellulare da utilizzare nella rigenerazione cardiaca. In studi recenti è stata posta attenzione anche nell'usare idrogel in combinazione con biomolecole: queste possono essere fattori di crescita o altri agenti terapeutici.

Esistono due approcci principali alla rigenerazione cardiaca basati sugli idrogel: il primo riguarda idrogel iniettabili, i quali fungono da sistema di somministrazione per i composti bioattivi o cellule che promuovono la riparazione e rigenerazione in situ, il secondo consiste nell'uso di patches cardiaci a base di idrogel [12].

2.2.1 Idrogel iniettabili

Solitamente, gli idrogel iniettabili sono presenti allo stato liquido in vitro, ma una volta iniettati nel sito dove è avvenuto l'infarto miocardico, l'idrogel subirà il processo di gelificazione che è stimolata dal microambiente del miocardio che influisce anche nel rilascio controllato di agenti bioattivi. Gli idrogel iniettabili, per evitare una risposta immunitaria, devono essere biocompatibili, biodegradabili e assorbibili.

Trattandosi di tessuto cardiaco, l'elasticità e la contrattilità dell'idrogel sono requisiti fondamentali, oltre alle caratteristiche chimiche e fisiche del microambiente. Altri fattori da considerare nell'inserimento di un idrogel impiantabile sono il tempo di somministrazione, gli stimoli necessari per il rilascio del composto bioattivo, il tempo di gelificazione e il rilascio controllato dei composti bioattivi.

L'iniezione di idrogel nel miocardio promuove la neo-angiogenesi e attenua il rimodellamento patologico, una delle principali cause dell'insufficienza cardiaca. Le vie di somministrazione degli idrogel iniettabili sono principalmente due: iniezione intramiocardica e intracoronarica o endovenosa eseguita attraverso l'uso di un catetere cardiaco. L'iniezione rappresenta un metodo di somministrazione minimamente invasivo e riduce i tempi di guarigione e il rischio di infezione. Gli idrogel forniscono la giusta resistenza meccanica supportando il tessuto

miocardico allo scopo di mantenere un'impalcatura vascolare, inoltre per via della loro porosità promuovono la vascolarizzazione. Grazie agli idrogel si ha un ripristino della funzione cardiaca che comporta la sopravvivenza dei cardiomiociti e un contrasto del rimodellamento patologico; inoltre un'ulteriore funzione è quella di poter migliorare la velocità di conduzione nel tessuto miocardico garantendo un mantenimento della conduttività elettrica.

La maggior parte degli studi recenti ha mostrato che usando idrogel iniettabili con all'interno cellule si ottiene una rigenerazione più importante del miocardio danneggiato rispetto a quella che si otterrebbe usando idrogel privi di cellule [7,12].

2.2.2 *Patches cardiaci*

L'uso di patches cardiaci limita le problematiche che potrebbero essere presenti nel caso di idrogel iniettabili: infatti la penetrazione dell'ago intracardiaco e l'impianto del biomateriale stesso potrebbero in alcuni casi danneggiare ulteriormente un tessuto già compromesso. Il patch cardiaco viene usato come impalcatura epicardica per fornire le molecole rigenerative in un modo più efficiente ai tessuti cardiaci, infatti il patch possiede una maggiore ritenzione del farmaco rispetto ad un idrogel iniettabile. Il patch, che si presenta solitamente come un piccolo disco o una matrice a forma quadrata, serve a rilasciare localmente cellule staminali o molecole bioattive, nella zona ischemica del cuore. Esistono casi in cui il patch viene utilizzato senza farmaci e/o cellule, fornendo supporto meccanico-strutturale al miocardio infartuato e proteggendolo da un eventuale rimodellamento patologico.

I patches a base di idrogel incorporati con nanotubi di carbonio permettono di ottenere un battito sincrono tra i cardiomiociti del tessuto miocardico nativo. Questo è possibile perché i nanotubi di carbonio agiscono come nano-ponti elettrici e permettono la conduzione del segnale elettrico cardiaco [7,12]. La possibilità di creare una conduzione all'interno della matrice è utile per ristabilire la contrazione originaria del tessuto cardiaco prima della lesione: questo è cruciale per prevenire contrazioni asincrone delle camere ventricolari e possibili aritmie.

In alcuni studi per la progettazione di patches cardiaci sono stati usati cardiomiociti di ratto neonatali o di pulcino embrionale oppure anche cellule staminali pluripotenti umane. I cardiomiociti derivati dalle cellule staminali umane migliorano la funzione contrattile di un cuore malato. In uno studio sull'IM, usando un modello suino, è stato prodotto un patch nel quale le cellule staminali mesenchimali sono state seminate in una matrice di collagene di tipo I; questo tipo di dispositivo ha mostrato un aumento della frazione di eiezione rispetto ad un cerotto senza cellule staminali [7,12].

Per la produzione di patches cardiaci vengono usati sia polimeri naturali come collagene, alginato, gelatina, chitosano, acido ialuronico, fibrina, ma anche polimeri sintetici come policaprolattone (PCL) che presentano però il problema di produrre residui tossici a seguito della degradazione; per risolvere la possibile tossicità sono stati creati patches cardiaci ibridi come ad esempio quelli in PCL e collagene di tipo I. Il poliglicolide-co- ϵ -caprolattone (PGCL) biodegradabile e il PCLA (policaprolattone-co-L-lattide) sono entrambi bioscaffold utilizzati rispettivamente con cellule staminali del midollo osseo e cellule staminali mesenchimali: queste matrici hanno dimostrato proprietà altamente rigenerative nel tessuto cardiaco.

L'impianto di un patch basato su cellule staminali migliora la funzione cardiaca, promuove la riparazione cardiaca e la rigenerazione del tessuto miocardico infartuato [7,12], come riportato nella Figura 2.2. Come è evidenziato dagli istogrammi, l'uso di cerotti funzionalizzati con cellule staminali porta ad un notevole miglioramento sia della frazione di eiezione (EF) sia dell'accorciamento della frazione stessa (FS).

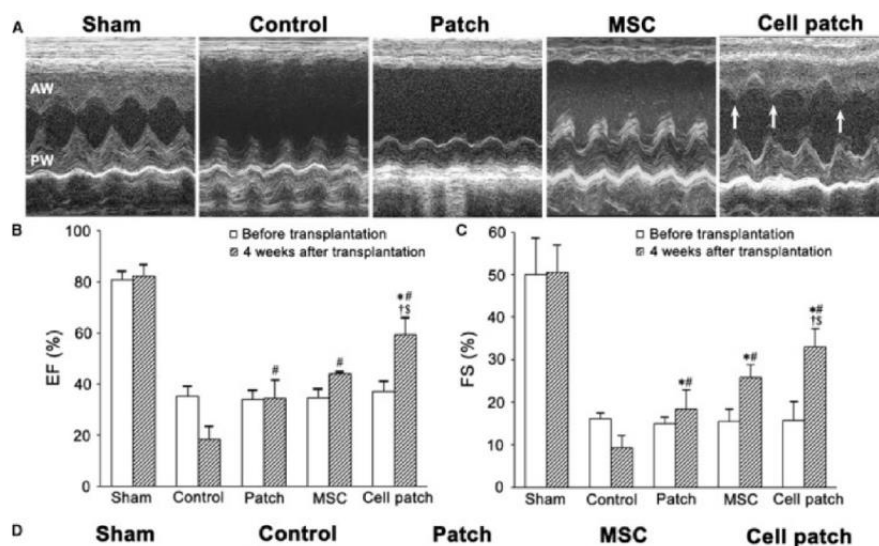


Figura 2.2: miglioramento della funzione cardiaca a seguito dell'impianto di patches cardiaci con cellule staminali. Nella prima riga vengono illustrati ecocardiogrammi rappresentativi delle pareti libere del ventricolo sinistro nei seguenti casi: campione di riferimento, controllo, presenza di patch cardiaco, presenza di cellule staminali mesenchimali, patches funzionalizzati con cellule staminali. Gli istogrammi sottostanti rappresentano rispettivamente: la frazione di eiezione (EF) e l'accorciamento della frazione (FS). Come si nota, usando patches con terapia cellulare si ottiene un miglioramento in entrambe le frazioni.

In alcuni casi nella produzione degli idrogel vengono utilizzati materiali elettroconduttivi che ripristinano la conduzione elettrica nella regione dove è presente il tessuto cicatriziale. Idrogel a base di gelatina, collagene o chitosano se arricchiti, ad esempio, con ossido di grafene o oro mostrano una migliore propagazione della conduzione elettrica cardiaca. Molti patches sono

anche a base di matrice extracellulare decellularizzata: questi dispositivi forniscono funzioni proangiogeniche e antifibrotiche con reazioni immunologiche minori.

Un aspetto critico associato all'uso di patches è che la loro applicazione avviene tramite sutura nell'area infartuata; questo può causare danni ulteriori al tessuto cardiaco. Altre problematiche che possono presentarsi sono: l'interazione non favorevole con il miocardio e la possibile fuoriuscita del patch dalla cavità toracica. Si deve quindi cercare di aumentare il più possibile l'adesione del cerotto al tessuto danneggiato, cercando di rivestirlo con sostanze adesive biocompatibili. Sono stati quindi sviluppati dispositivi a base di biomateriali altamente adesivi che non necessitano dell'operazione di sutura per rimanere in situ.

Le applicazioni cliniche dei patches a base di idrogel non sono ancora molto sviluppate per via della chirurgia invasiva che comporta l'applicazione. Inoltre è difficile riuscire a conservare correttamente le cellule staminali fino alla completa installazione del patch.

Nonostante le problematiche che si possono incontrare nell'uso di questi dispositivi, è importante sottolineare che mediante il loro utilizzo si ha la massima adesione con il tessuto danneggiato, condizione irraggiungibile per qualsiasi altra attuale soluzione terapeutica.

2.2.3 Innesti vascolari e nanoparticelle

Oltre a riparare il miocardio danneggiato e prevenire il rimodellamento patologico, è importante ripristinare anche l'afflusso di sangue nell'area danneggiata dal IM. Per questo motivo vengono usati gli innesti vascolari ingegnerizzati (Tissue Engineered Vascular Grafts, TEVGs) che permettono di fornire direttamente il sangue al tessuto infartuato. L'uso di TEVG è un approccio moderno ed è basato sull'inserimento in situ di innesti creati a partire da biomateriali ingegnerizzati caricati con molecole bioattive, le quali sono necessarie per riparare il danno al tessuto cardiaco. A volte vengono seminate all'interno dell'innesto cellule endoteliali per favorire anche la formazione di un neo-endotelio.

Nella costruzione dei TEVG sia la dimensione dei vasi sia le proprietà meccaniche e biochimiche devono essere determinate accuratamente. Gli innesti devono essere inoltre resistenti ai fenomeni di iperplasia intimale, stenosi, calcificazione. I TEVGs hanno mostrato un grande successo nella sostituzione di vasi sanguigni di grandi dimensioni, mentre per i vasi più piccoli la situazione è molto più complessa. Per la costruzione di TEVGs vengono usati sia biomateriali naturali che sintetici entrambi accoppiati con agenti di reticolazione. La scelta di usare idrogel naturali o sintetici dipende esclusivamente dal risultato che si vuole ottenere: infatti, con idrogel naturali si ha una maggiore biocompatibilità mentre usando idrogel sintetici si ha un miglioramento nelle proprietà meccaniche. Vengono usati anche idrogel ibridi che

possiedono entrambe le proprietà. Un esempio è acido poli-L-lattico (PLLA) + PCL + eparina: questo innesto ibrido viene usato per ottenere una grande adesione dell'endotelio allo scaffold. I metodi di fabbricazione per i TEVGs sono l'elettrofilatura, filatura a separazione di fase, colata in solvente, stampa tridimensionale. È importante scegliere correttamente sia la natura chimica che le proprietà fisiche dei polimeri utilizzati; nei TEVGs è richiesta anche una buona permeabilità per lo scambio molecolare con il sangue. Ai TEVGs devono corrispondere le proprietà meccaniche dei vasi sanguigni come l'elasticità, la resistenza meccanica e la flessibilità per resistere allo stress meccanico provocato dalla pressione sanguigna. Nella produzione dei TEVGs devono essere usati materiali non trombotici in quanto l'impianto è a contatto diretto con il sangue. La trombosi può essere innescata dalla deposizione di proteine e piastrine sulla superficie dei TEVGs, per questo motivo è necessario rendere inerte la loro superficie con metodi di funzionalizzazione superficiale usando sostanze come eparina, inibitori piastrinici e agenti fibrinolitici. Alla superficie dei TEVGs possono essere anche aggiunte molecole come RGD che favoriscono l'adesione delle cellule endoteliali.

Sia gli idrogel impiantabili, sia i patches e i TEVG sono soluzioni terapeutiche invasive: una futura tendenza sarà quella di usare nanoparticelle che possono essere somministrate attraverso metodi minimamente invasivi. Le nanoparticelle sono tecnologie usate in nanomedicina e permettono di somministrare farmaci e agenti chimici in situ. I farmaci, per raggiungere il sito bersaglio, vengono legati alle particelle solide come, ad esempio, l'oro nel caso di nanoparticelle inorganiche oppure possono essere incapsulati in liposomi come avviene nel caso di nanoparticelle lipidiche. Le nanoparticelle aiutano a recuperare i cardiomiociti lesionati in diversi modi poiché possono essere caricate o modificate con molecole bioattive come: micro-RNA, fattori di trascrizione, cellule staminali e altri agenti terapeutici [7,12]. In nanomedicina i nanomateriali possono essere costituiti da diverse molecole aggregate per formare forme diverse di nanocarriers come, ad esempio, nanobarre, nanotubi, nanofili e nanoparticelle [7,12]. I nanomateriali hanno diverse proprietà tra le quali: stabilità, biodegradabilità, conduttività elettrica, proprietà catalitiche, proprietà ottiche e un elevato rapporto superficie/volume. Poiché le nanoparticelle possiedono un alto rapporto superficie/volume possono caricare una quantità maggiore di farmaco o molecole bioattive rispetto agli altri sistemi di somministrazione. Le nanoparticelle possono essere somministrate per via orale o endovenosa, a volte è necessario incorporarle in un gel per rendere più agevole la somministrazione endovenosa. Le principali nanoparticelle usate nella rigenerazione cardiaca sono a base di lipidi, materiali polimerici e inorganici.

2.2.4 Confronto tra i diversi approcci nella rigenerazione cardiaca a seguito di IM

Confrontando i quattro tipi di approcci sopra descritti si ottengono le seguenti conclusioni.

Gli idrogel iniettabili hanno il vantaggio di essere applicati tramite una procedura chirurgica non invasiva rispetto ai metodi tradizionali di cura dell'IM, riescono a garantire proprietà chimico e fisiche corrette per il microambiente nel quale saranno poi inseriti. Il loro ruolo principale è quello di fungere da matrice di supporto per proteggere cellule o agenti terapeutici incapsulati all'interno dell'idrogel stesso.

I patches cardiaci forniscono un adeguato supporto meccanico e se vengono rivestiti con sostanze adesive migliorano l'interazione con il miocardio: questo porta ad avere una maggiore diffusione delle cellule e farmaci contenuti all'interno del patch nel sito danneggiato.

Il punto di forza degli innesti vascolari è di riuscire a fornire sangue direttamente al tessuto lesionato e hanno importanti proprietà meccaniche che permettono di resistere allo stress meccanico dato dalla pressione del sangue.

L'uso di nanoparticelle migliora la sopravvivenza e la proliferazione dei cardiomiociti, riescono a garantire un rilascio prolungato di cellule o biomolecole migliorando l'efficacia della terapia cellulare e riducendo i possibili effetti collaterali.

Le principali caratteristiche relative ai diversi metodi vengono riportate nella Tabella 2.1.

Tabella 2.1: principali caratteristiche dei diversi approcci nella cura di IM.

	Metodi di Applicazione	Vantaggi	Sfide
Idrogel iniettabili	Via intramiocardica e intracoronarica	Procedura minimamente invasiva, ottima matrice di supporto	Bassa ritenzione di cellule e farmaci, difficoltà d'adesione e scarse proprietà meccaniche, potenziale immunogenicità
Patches cardiaci	Suturati chirurgicamente sull'epicardio oppure viene indotta una forte adesione modificando la superficie dei patches stessi	Fornire supporto meccanico e migliorare l'interazione con il tessuto cardiaco	Ridurre la complessità dell'inserimento nel tessuto danneggiato
Innesti vascolari	Innestati in situ attraverso procedure minimamente invasive	Altamente non immunogenici, garantiscono un forte supporto meccanico	Complicazioni meccaniche a lungo termine dovute allo stress causato dalla pressione sanguigna.
Nanoparticelle	Vettori di rilascio sia per cellule, farmaci e proteine	Garantire un rilascio prolungato in modo da aumentare l'efficacia della terapia.	Non equilibrio tra biodegradazione e resistenza meccanica

2.2.5 Idrogel intelligenti: rigenerazione del tessuto cardiaco

Per la rigenerazione del tessuto cardiaco si fanno sempre più strada quelli che vengono definiti "idrogel intelligenti" ovvero idrogel che cambiano il loro stato fisico in risposta agli stimoli

esterni. Gli stimoli possono essere, ad esempio, cambiamenti di temperatura, pH, variazione di concentrazione di ioni, ipossia e presenza di ROS (Reactive Oxygen Species) [12,13]. Gli idrogel intelligenti agiscono nei siti danneggiati post-infarto in diversi modi: rilasciano fattori angiogenici, forniscono supporto strutturale all'area lesionata e migliorano la conduttività.

Gli idrogel sensibili alla temperatura passano da liquidi solubili a gel insolubili nel momento in cui viene raggiunta una temperatura critica; infatti, inizialmente l'idrogel in forma liquida viene iniettato in situ tramite catetere poi, al raggiungimento della temperatura corporea (37 °C), solidifica. Usando idrogel termosensibili assieme a farmaci proangiogenici la rigenerazione del tessuto cardiaco è accelerata.

Gli idrogel sensibili al pH sono costituiti da una struttura polimerica principale con gruppi acidi e basici che idrolizza velocemente in condizioni di ambiente acido. Quando invece la catena principale è esposta ad ambienti basici, la catena principale si ionizza e l'idrogel passa dallo stato di gel a quello di liquido. Vengono usati a seguito di un evento di IM poiché nella zona lesionata viene osservato un pH più basso rispetto ad un tessuto cardiaco sano. Vengono spesso usati idrogel sensibili sia alla temperatura che al pH che consentono il rilascio di fattori di crescita: questo porta ad una riduzione delle cicatrici, aumento della densità dei microvasi, miglioramento del flusso sanguigno e della funzione cardiovascolare.

Negli idrogel ioni-sensibili la conduttività elettrica del materiale può essere modificata in presenza di diverse condizioni ioniche. Inizialmente l'idrogel si trova in uno stato liquido con cariche fisse sulla catena principale; a seguito dell'iniezione, l'interazione tra i diversi ioni presenti in situ e quelli nella catena principale provoca il passaggio dell'idrogel dallo stato liquido a quello di gel. Gli idrogel sensibili agli ioni hanno diverse proprietà: buona conduttività elettrica, biocompatibilità, buone proprietà meccaniche e la capacità di legarsi con molecole cariche.

L'ipossia è un aspetto fondamentale che avviene durante un evento di IM, accelera la morte cellulare, la necrosi tissutale, la perdita dell'integrità della membrana e l'apoptosi dei cardiomiociti. Gli idrogel in grado di agire in presenza di ipossia sono usati nella rigenerazione del tessuto miocardico per cercare di ridurre il più possibile la morte cellulare. Questi idrogel vengono costruiti usando biomateriali in grado di rilasciare ossigeno attraverso reazioni chimiche, le quali avvengono una volta che gli idrogel sono iniettati in situ. I materiali più usati per la produzione di questi idrogel sono il perossido di calcio (CaO_2), il perossido di magnesio (MgO_2), perossido di idrogeno (H_2O_2) e percarbonato di sodio ($\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}_2$). Potendo garantire un alto contenuto di ossigeno, questi idrogel sono funzionali per garantire la sopravvivenza dei cardiomiociti.

I ROS (Reactive Oxygen Species) svolgono un ruolo importante nell'organismo a seguito di IM poiché permettono di migliorare la comunicazione cellulare, la trasduzione del segnale, la regolazione dell'infiammazione e la proliferazione cellulare. Quando i ROS sono sovrapprodotti, causano stress ossidativo e infiammazione, provocando danni irreversibili al miocardio [13]. Gli idrogel sensibili ai ROS possiedono proprietà antiossidanti e possono migliorare le lesioni causate da stress ossidativo nei cardiomiociti dopo IM.

Capitolo 3: Applicazioni di idrogel nella rigenerazione del tessuto osseo e cartilagineo

3.1 Caratteristiche degli idrogel nell'ingegneria tessutale ossea

Il tessuto osseo è un tessuto connettivo particolarmente duro e denso, resistente a compressione, trazione e torsione. All'interno del tessuto osseo è presente sia una componente cellulare, composta principalmente da tre tipi di cellule (osteoblasti, osteociti e osteoclasti), sia una matrice extracellulare caratteristica, composta per il 35% da materiale organico e per il 65% da materiale inorganico.

Il tessuto osseo è uno dei tessuti corporei maggiormente trapiantati. Ogni anno vengono eseguiti in tutto il mondo più di 2 milioni di trapianti ossei [14]. Negli anni il costo sanitario per il trattamento di traumi, infezioni e tumori al tessuto osseo è aumentato continuamente [15]. L'autoguarigione ossea è limitata e spesso, essendo non sufficiente, si rende necessario il trattamento chirurgico. Questi interventi consistono principalmente nell'inserimento di innesti ossei o protesi metalliche, che sono associati a possibili infezioni, dolore, alto costo sanitario e spesso comportano la necessità di ulteriori interventi chirurgici da effettuare nel tempo per via della degradazione degli impianti o per sostituire una protesi troppo piccola, evento frequente nel caso di pazienti di giovane età.

Nel caso di lesioni gravi, malformazioni congenite, artrite reumatoide o osteoporosi, il processo dell'autoguarigione è comunque troppo lungo e inefficace. Le cause della maggior parte di difetti e lesioni ossee possono essere classificate come: fratture, infezioni, tumori e malattie ereditarie. Le fratture ossee sono considerate una delle principali cause delle lesioni ossee e possono verificarsi in diverse parti del corpo come, ad esempio, cranio, colonna vertebrale, caviglia, tibia e sono causate principalmente da traumi. Le infezioni come l'osteomielite si manifestano con la presenza di dolore, arrossamento e febbre; se non vengono trattate adeguatamente possono portare a condizioni irreversibili alle quali segue obbligatoriamente l'amputazione dell'arto. Tutte le condizioni patologiche che si verificano nel tessuto osseo possono produrre difetti ossei di una certa misura: se il difetto supera una dimensione critica, allora necessario intervenire chirurgicamente.

Per evitare la necessità di interventi chirurgici invasivi, l'ingegneria tessutale offre la possibilità di utilizzare biomateriali, contenenti al loro interno cellule staminali e fattori di crescita, che promuovono la rigenerazione ossea. Le matrici costituite dai biomateriali hanno l'obiettivo di fornire supporto creando un ambiente adatto per crescita e proliferazione cellulare.

Gli idrogel usati per la rigenerazione ossea devono soddisfare i seguenti requisiti:

1. non essere immunogenici o citotossici per evitare una possibile risposta infiammatoria e immunitaria nel paziente;
2. essere osteoinduttivi, osteoconduttivi e osteogenici, caratteristiche necessarie per ottenere una rigenerazione ossea;
3. imitare il più possibile l'ECM per facilitare l'adesione, la propagazione e la differenziazione cellulare in situ;
4. essere degradabili da enzimi endogeni o mediante idrolisi poiché contemporaneamente alla loro degradazione si abbia la formazione di nuovo tessuto osseo;
5. possedere stabilità strutturale e resistenza meccanica;
6. avere una porosità adeguata a consentire lo scambio di nutrienti, ossigeno e rifiuti metabolici con il tessuto circostante;
7. poter essere iniettabili attraverso tecniche non invasive per ridurre il dolore al paziente e semplificare il processo di somministrazione.

Il processo di rigenerazione ossea consiste quindi nella progettazione di idrogel che riescano ad incapsulare al loro interno cellule, proteine e sostanze bioattive per poi poterle rilasciare una volta iniettati in situ. Quindi, durante la progettazione degli idrogel, si devono considerare tre elementi fondamentali: impalcatura, cellule e fattori di crescita.

Per ottimizzare il ruolo degli idrogel è necessario scegliere la struttura fisica ottimale per il sito di destinazione. Le tre principali strutture fisiche in cui si trovano gli idrogel sono: microsfele, nanogel e fibre.

Nella configurazione a microsfele si trovano maggiormente gli idrogel polimerici. Le microsfele consentono una maggiore capacità di trasferimento di massa, utile nel caso di somministrazione di farmaci o cellule staminali. Negli ultimi anni è stata creata una tecnica per la produzione di sfere di idrogel con una dimensione minore a 100 μm . In questa tecnica microfluidica di non equilibrio sono presenti alginato di sodio in soluzione acquosa e acetato di metile rispettivamente impiegati come fase dispersa e fase continua [16]. L'acetato di metile è un solvente polare e le soluzioni acquose si dissolvono al suo interno. La soluzione acquosa di alginato di sodio forma goccioline di non equilibrio nell'acetato di metile e le molecole d'acqua presenti nelle goccioline vengono gradualmente disciolte nella fase continua e i volumi delle goccioline vengono gradualmente diminuiti [16]. Le goccioline vengono poi successivamente gelificate formando microsfele di idrogel con volumi molto più piccoli di quelli delle goccioline inizialmente formate [16].

Le nanoparticelle di idrogel (nanogel) sono un gruppo di nanoparticelle sferiche formate da catene tridimensionali fisicamente o chimicamente reticolate che possono rigonfiarsi se inserite in ambiente acquoso. I nanogel possiedono sia le caratteristiche degli idrogel, ovvero biocompatibilità e proprietà meccaniche, sia quelle delle nanoparticelle, ovvero hanno un alto rapporto superficie/volume che gli consente di trattenere una quantità maggiore di farmaco.

Gli idrogel fibrosi si presentano come una struttura fibrosa con un diametro che varia da nanometri fino a diversi micron. Produrre fibre di idrogel comprende due fasi: il processo di filatura e successivamente la reticolazione tra le varie fibre. Le fibre possono essere ottenute usando diversi metodi: elettrofilatura, filatura del gel e stampa 3D. Successivamente le fibre vengono esposte a radiazione termica o raggi UV, glutaraldeide o enzimi, per formare infine una reticolazione di fibre di idrogel. Rispetto alle precedenti strutture, le fibre di idrogel possono essere allineate secondo una specifica direzione e quindi sviluppare una direzione preferenziale di carico.

Gli idrogel usati nella rigenerazione ossea possono essere anche suddivisi sulla base di ciò che contengono: fattori di crescita o cellule staminali.

I fattori di crescita sono proteine in grado di promuovere la riparazione ossea e l'osteogenesi. I principali fattori di crescita usati sono: i fattori di crescita insulino-simili (IGF), il fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF), il fattore 1- α derivato dalle cellule stromali (SDF-1 α) e il fattore di crescita dei fibroblasti (FGF).

Le cellule staminali sono un tipo di cellule con un potenziale di rinnovamento e differenziazione infinito che gli consente di differenziarsi in vari tipi di cellule. Nonostante il successo ottenuto nella rigenerazione ossea usando cellule staminali embrionali, queste sono soggette a problematiche etiche e morali; per evitare questo problema, la ricerca si è concentrata nell'usare cellule staminali mesenchimali (MSC) che possono differenziarsi in osteoblasti. Le MSC possono suddividersi in cellule mesenchimali del midollo osseo (BMSC) e cellule staminali mesenchimali del cordone ombelicale (UCMSC). Le BMSC sono le cellule più utilizzate e studiate per via della loro facile accessibilità e bassa immunogenicità.

Se le cellule staminali venissero iniettate direttamente in situ, il brusco cambiamento dell'ambiente provocherebbe la loro morte, invece nel caso dei fattori di crescita il loro inserimento in situ provocherebbe la perdita della loro attività biologica. Per questo motivo vengono usati gli idrogel, per ricreare un ambiente ottimale sia per la sopravvivenza cellulare ma anche per mantenere l'attività biologica dei fattori di crescita.

Gli idrogel usati nella rigenerazione ossea comprendono idrogel naturali e sintetici, la scelta in fase di progettazione dipende dalla funzione che l'idrogel avrà una volta iniettato in situ. Gli

idrogel naturali offrono la possibilità di ricreare un ambiente simile all'ECM quindi garantiscono una forte biocompatibilità e bassa risposta immunitaria, inoltre riescono ad indurre una maggiore adesione e proliferazione cellulare rispetto agli idrogel sintetici. Invece, nel caso l'idrogel serva per fornire stabilità meccanica, è necessario usare gli idrogel sintetici che possiedono adeguate proprietà meccaniche.

Per quanto riguarda gli idrogel a base di polimeri naturali, la gelatina è il principale polimero studiato come vettore di trasporto per fattori osteoinduttivi [17]. Come alternativa agli idrogel naturali, vengono principalmente considerati gli idrogel a base di PEG. Nuovi copolimeri a base di PEG, PLA e diossano sono stati studiati a causa della loro stabilità termica [17]. Un ulteriore esempio è il PEG funzionalizzato con RGD e successivamente incorporato nell'idrogel: l'uso di RGD porta ad aumento della proliferazione e della differenziazione degli osteoprogenitori [17].

Nei prossimi paragrafi vengono riportati due studi clinici che descrivono la produzione di idrogel iniettabili utilizzabili come terapia per la rigenerazione ossea.

3.2 Applicazione clinica di idrogel a base di gelatina contenenti FGF-2 per la cura di osteonecrosi della testa femorale

I fattori di crescita, growth factors (GFs), vengono definiti come poli-peptidi solubili che regolano la proliferazione e la differenziazione cellulare per aumentare o diminuire specifiche popolazioni cellulari legandosi ai recettori e trasmettendo segnali intracellulari [18]. I GFs hanno un ruolo nella regolazione dei processi fisiologici poiché si legano ai recettori sulla superficie delle cellule bersaglio che agiscono come trasduttori di segnale intercellulare. I GFs possono essere classificati in diverse famiglie in base alle caratteristiche che possiedono, ad esempio, la famiglia dei FGFs rappresenta i fattori di crescita dei fibroblasti. Tra tutti i FGFs, FGF-2, FGF-9 e FGF-18 sono stati identificati per la prima volta nelle cellule mesenchimali e negli osteoblasti aggregati nel periodo fetale durante il quale gli FGF svolgono una funzione importante nello sviluppo scheletrico [18]. FGF-2, noto come FGF di base, promuove la proliferazione e differenziazione cellulare, e contribuisce all'angiogenesi e alla guarigione di ferite ossee poiché riesce ad aumentare il numero di osteoblasti. Inoltre, FGF-2 induce la proliferazione delle cellule staminali mesenchimali che contribuiscono ad una rigenerazione ossea. Il problema principale del FGF-2 è la sua breve emivita: infatti diversi studi mostrano che è altamente suscettibile al calore e agli enzimi proteolitici come la tripsina; pertanto è necessario creare una matrice di supporto che riesca ad incapsulare FGF-2 e veicolarlo in situ.

L'idrogel di gelatina funge da impalcatura per la proliferazione cellulare, promuove la rigenerazione dei tessuti biologici e mantiene la bioattività di FGF-2. Gli idrogel di gelatina vengono prodotti dalla reticolazione chimica della gelatina, che consente l'immobilizzazione e la regolazione del rilascio locale di FGF-2. In questa matrice di supporto, FGF-2 viene rilasciato nel momento in cui l'idrogel viene degradato per generare frammenti di gelatina idrosolubile. Queste strutture di idrogel possono essere applicate tramite iniezione: vengono confezionate in appositi kit contenenti l'idrogel liofilizzato e la soluzione di FGF-2 in siringhe distinte. Il processo di formazione dell'idrogel dal kit viene riportato nella Figura 3.1.

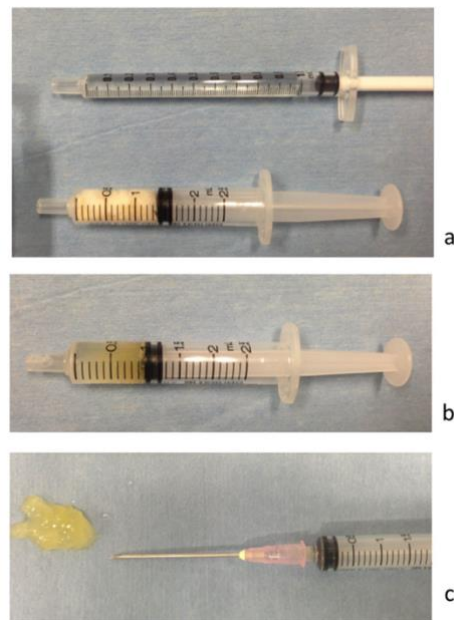


Figura 3.2:a) nella siringa superiore è contenuta la soluzione con all'interno FGF-2, nella siringa inferiore è presente la gelatina liofilizzata; b) siringa contenente idrogel di gelatina con all'interno incapsulato FGF-2; c) è rappresentata la struttura fisica che avrà l'idrogel una volta iniettato in situ.

Si definisce necrosi avascolare o ischemica della testa del femore quella condizione patologica dovuta ad insufficiente perfusione ematica che, nella maggior parte dei casi, se diagnosticata tardivamente, induce una degenerazione artrosica precoce ed ampiamente invalidante [1*]. Per la cura dell'osteonecrosi della testa femorale, lo studio clinico riportato in [19] ha confermato che la somministrazione di idrogel a base di gelatina contenente FGF-2 porta ad una rigenerazione del tessuto osseo [19]. Lo studio prevedeva la presenza di 10 pazienti (5 di sesso maschile e 5 femminile) con un'età media di 39,8 anni, affetti da osteonecrosi femorale. L'intervento è stato eseguito in anestesia lombare con un'incisione di 1 cm attraverso la quale è stato somministrato per via percutanea un idrogel contenente 800 μ g di FGF-2, come illustrato

in Figura 3.2. La durata dell'operazione è stata di 18 minuti e la deambulazione era consentita a partire dal giorno successivo all'intervento.

Lo studio aveva diversi obiettivi: monitorare l'eventuale incidenza di eventi avversi, valutare l'inibizione del collasso della testa femorale, segnalare eventuali cambiamenti nella malattia, eseguire le opportune valutazioni cliniche (punteggio analogico visivo per il dolore, punteggio dell'anca di Harris, punteggio di attività dell'Università della California) e valutazione della rigenerazione ossea nell'area interessata [18,19]. Alla fine dello studio tutti i punteggi clinici sono aumentati e si è osservata una rigenerazione ossea. Le risonanze magnetiche dopo 6 mesi dall'intervento hanno mostrato un cambiamento di intensità che rappresenta una avvenuta rigenerazione ossea; invece quelle dopo 12 mesi hanno mostrato che l'intensità del segnale nella testa femorale è quasi ritornato alla normalità. Inoltre le funzioni dell'articolazione dell'anca sono migliorate significativamente. Pertanto è stato confermato che l'idrogel a base di gelatina è un'ottima matrice per il trasporto di FGF-2 e la somministrazione locale di FGF-2 è sicura [18,19].

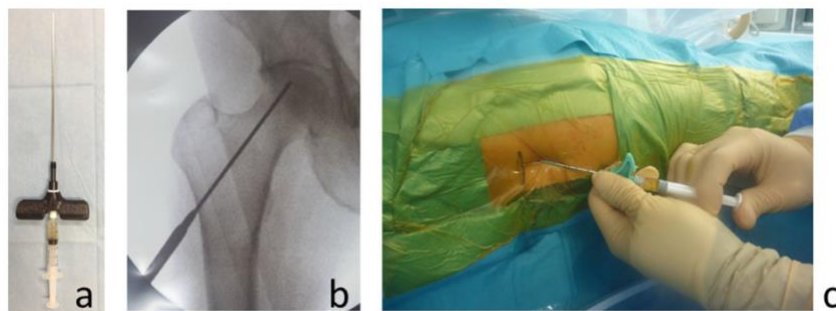


Figura 3.3: iniezione percutanea locale di fattori di crescita nella testa femorale. Nell'immagine a) viene illustrata la siringa per la somministrazione percutanea; nella figura b) viene rappresentata un'immagine intraoperatoria della siringa che raggiunge il sito dell'iniezione; nell'immagine c) è illustrato il momento in cui, spingendo sullo stantuffo, viene iniettato l'idrogel in situ.

3.3 Idrogel bifunzionale a base di alginato e chitosano usato in terapia contro il tumore osseo

Questo studio è stato condotto da Luo et al., in Cina grazie alla collaborazione tra il dipartimento di ortopedia e farmacia del General Hospital of Western Theater Command, la School of Clinical Medicine del Chengdu Medical College e la School of Materials Science and Engineering del Southwest Jiaotong University.

La principale terapia usata nella cura del tumore osseo consiste nella rimozione chirurgica e/o nella terapia chemio/radioterapica. Nonostante il successo del trattamento chirurgico, è generalmente difficile rimuovere completamente le cellule tumorali intorno ai tessuti ossei: per

questo motivo vengono utilizzate chemio/radioterapia, che provocano però una grande sofferenza nel paziente. Inoltre, l'intervento chirurgico può portare alla formazione di difetti ossei che non sono in grado di rigenerarsi autonomamente. In questo contesto è quindi necessario sviluppare una tecnologia che permetta di eliminare le cellule tumorali residue e contemporaneamente promuova la rigenerazione dei difetti ossei provocati dalla chirurgia.

Nella cura di tumori, la terapia fototermica sta emergendo come nuovo approccio e consiste nel convertire la luce nella frequenza del vicino infrarosso (NIR) in calore localizzato per l'eliminazione delle cellule tumorali. Molti materiali quali, ad esempio, nanotubi di carbonio, grafene e rame, sono reattivi al NIR, ma molti di questi non presentano le caratteristiche di biocompatibilità e biodegradabilità necessarie alle applicazioni cliniche. La polidopamina (PDA) è emersa in questo contesto perché possiede sia il requisito di reattività al NIR sia i requisiti di biocompatibilità e biodegradabilità.

Trattandosi di tessuto osseo, la nano-idrossiapatite (n-HA) è un materiale inorganico che viene spesso utilizzato per ottenere una rigenerazione e riparazione ossea. In questo studio la PDA viene usata per modificare l'n-HA, ottenendo PDA legata con n-HA (PHA); inoltre, i gruppi funzionali presenti nella PDA consentono la funzionalizzazione con farmaci antitumorali come cisplatino (DDP).

Nello studio è stato prodotto un idrogel bifunzionale iniettabile. È stato usato PDA per modificare n-HA e immobilizzare cisplatino (DDP) per ottenere particelle PHA-DDP. Successivamente è stato introdotto questo sistema di particelle nella reazione con basi di Schiff tra alginato (OSA) e chitosano (CS) per costruire l'idrogel bifunzionale iniettabile. Alginato e chitosano sono stati scelti per via della loro biocompatibilità e biodegradabilità e per aumentare la formazione di una reticolazione tra i due è stato aggiunto il tetraborato di sodio (Borax), il quale rende l'ambiente di reazione alcalino e favorisce la reazione di Schiff.

Al fine di valutare gli effetti della terapia tumorale in vivo sono stati creati modelli tumorali nei topi BALB/c iniettando cellule 4T1 (1×10^6 cellule/topo) nel fianco destro [20]. Quando il volume del tumore è arrivato a circa 200 mm³ varie formulazioni di idrogel (Blank, OSA-CS-Borax, OSA-CS-PHA, OSA-CS-PHA-DDP e OSA-CS-PHA-DDP+NIR) sono state iniettate nel centro dei tessuti tumorali [20]. L'esposizione alla NIR è stata eseguita circa 48 ore dopo la somministrazione degli idrogel. Successivamente dopo 10 giorni i topi sono stati sottoposti ad eutanasia e i tessuti tumorali sono stati asportati per pesarli e colorarli con ematossilina e eosina H&E; inoltre sono stati raccolti vari organi per verificare la presenza di eventuali effetti collaterali [20].

I risultati dimostrano che nei gruppi Blank, OSA-CS-Borax e OSA-CS-PHA i volumi tumorali si sono estesi significativamente dopo 10 giorni, mentre i volumi tumorali dei gruppi OSA-CS-PHA-DDP, OSA-CS-PHA-DDP+NIR sono diminuiti [20]. Quando l'idrogel OSA-CS-PHA-DDP viene iniettato in situ, grazie agli effetti fototermici del PDA e il rilascio di molecole di DDP, inibisce la crescita tumorale. Infatti con l'applicazione NIR, il PDA presente nel PHA agisce assorbendo la luce NIR e la converte in calore, che poi viene usato per eliminare le cellule tumorali; inoltre, NIR distrugge anche i legami idrogeno presenti tra DDP e PDA e questo provoca il rilascio di DDP nei siti tumorali. Pertanto l'idrogel OSA-CS-PHA-DDP come materiali fototermico è ideale nell'ablazione dei tumori ossei.

Inoltre, i risultati tramite colorazione H&E hanno dimostrato che l'idrogel OSA-CS-PHA-DDP non presenta evidenti effetti collaterali sugli organi [20].

Dato che costruire difetti ossei di grandi dimensioni era difficile nei topi, per valutare il potenziale osteogenico degli idrogel sono stati stabiliti modelli di difetti ossei nei conigli [20]. Sedici conigli (2-2,5 Kg) sono stati selezionati per valutare la rigenerazione ossea tramite il modello di difetto del femore. I conigli sono stati divisi casualmente in quattro gruppi: Blank, OSA-CS-Borax, OSA-CS-PHA e OSA-CS-PHA-DDP. I conigli sono stati sacrificati dopo 12 settimane dall'intervento chirurgico tramite embolia aerea.

Il gruppo OSA-CS-PHA e il gruppo OSA-CS-PHA-DDP sono i più favorevoli alla crescita del tessuto osseo rispetto ai gruppi Blank e OSA-CS-Borax [20]. L'idrogel OSA-CS-PHA-DDP presenta un'elevata capacità di osteogenesi come mostrato in Figura 3.3. I risultati ottenuti tramite colorazione H&E hanno permesso di verificare che i tessuti ossei di nuova formazione riempivano i difetti ossei presenti. L'idrogel bifunzionale supporta la crescita delle cellule staminali mesenchimali ossee grazie alla presenza di gruppi funzionali del PDA e facilita ulteriormente la formazione di nuovi tessuti ossei. Questo avviene perché l'idrogel contiene n-HA che può rilasciare Ca^{2+} e fosfato, che hanno la capacità di stimolare l'osteogenesi. Inoltre PDA contiene gruppi funzionali idrofilici che portano ad un miglioramento dell'adesione e proliferazione cellulare. Inoltre la capacità di formazione ossea del gruppo OSA-CS-PHA-DDP era simile a quella del gruppo OSA-CS-PHA: questo indica che l'introduzione del DDP non ha influenzato significativamente la capacità di rigenerazione dell'idrogel [20].

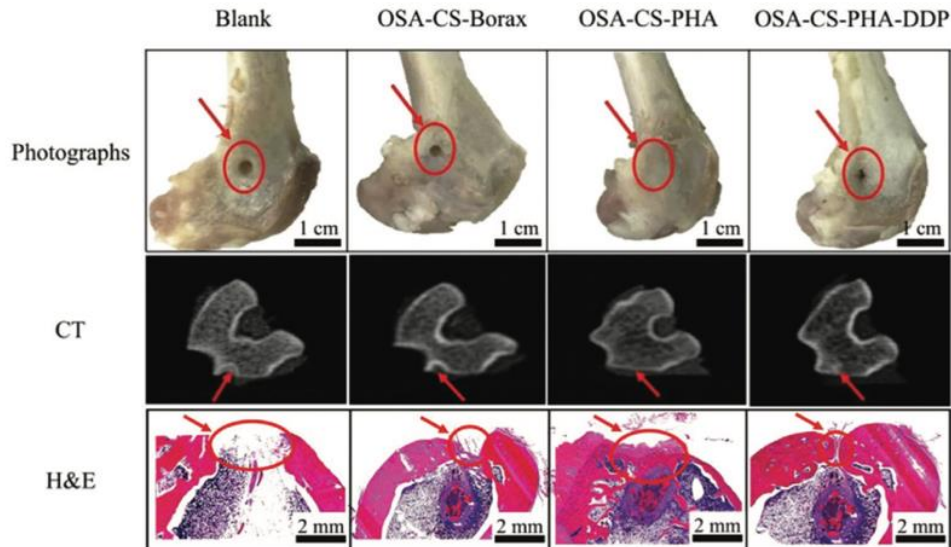


Figura 3.3: L'uso di OSA-CS-PHA-DDP favorisce l'osteogenesi. Nella prima riga vengono riportate le fotografie dopo l'applicazione in vivo dell'idrogel nei quattro casi: senza idrogel, idrogel OSA-CS-Borax, idrogel OSA-CS-PHA e idrogel OSA-CS-PHA-DDP. Nella seconda riga sono riportate le immagini di tomografia computerizzata. Nella terza riga sono riportate le immagini ottenute secondo la colorazione H&E. Come si nota dalle immagini, il complesso PHA-DDP favorisce una maggiore osteogenesi.

3.4 Il ruolo degli idrogel nella rigenerazione della cartilagine articolare

L'ingegneria dei tessuti muscoloscheletrici si occupa di sviluppare sostituti biologici con lo scopo di riparare e rigenerare ossa, cartilagine e tessuti connettivi.

All'interno del corpo umano sono presenti tre tipi di cartilagine: elastica, fibrosa e ialina; in particolare quella ialina, chiamata anche cartilagine articolare, è il tipo più comune di cartilagine presente nelle articolazioni.

La cartilagine articolare (CA) è un tessuto connettivo fibroso che contiene condrociti e ECM; quest'ultima è formata da collagene e proteoglicani, responsabili dell'architettura d'insieme e delle caratteristiche funzionali del tessuto [21]. La cartilagine articolare svolge diverse funzioni: assorbire le forze d'impatto, sopportare forti stress meccanici di compressione, trasferire il carico all'osso sottostante e consentire il movimento delle articolazioni. Da un punto di vista strutturale la cartilagine articolare è divisa in quattro zone: superficiale, centrale, profonda e calcificata; in generale si può anche dividere in sole due macroregioni: superficiale e profonda. La CA superficiale funge da superficie di scorrimento garantendo lubrificazione e bassa usura del giunto, la sezione profonda rappresenta il collegamento tra cartilagine e osso e fornisce la massima resistenza alle forze di compressione durante il movimento del giunto.

La degenerazione della cartilagine è principalmente provocata da lesioni o artrosi. Le lesioni possono derivare da traumi oppure da usura provocata da un ripetitivo gesto meccanico; l'osteoartrite è una patologia che porta alla degradazione della cartilagine.

Al contrario del tessuto osseo, alla cartilagine manca la proprietà auto-rigenerativa perché è assente una rete vascolare interna: per questo motivo la ricerca si è sempre concentrata nello sviluppare possibili trattamenti per riparare e rigenerare la cartilagine danneggiata.

Tradizionalmente in caso di lesione, l'iniezione diretta di condrociti all'interno di difetti cartilaginei nell'uomo, chiamata comunemente trapianto condrocitico, è stata utilizzata a partire dal 1994 e clinicamente ha portato a risultati positivi [21]. In alternativa ai trattamenti chirurgici, la cartilagine può essere ottenuta tramite l'ingegneria tissutale, la quale permette lo sviluppo di matrici di supporto per terapie cellulari. Tramite l'ingegneria tissutale si può arrivare a produrre terapie mirate alla rigenerazione della cartilagine prima di arrivare alla condizione in cui la cartilagine è degradata completamente.

Inizialmente venivano usati biomateriali con grandi strati idratati in superficie, ottimi per funzionare come lubrificanti e consentire il movimento articolare. Tuttavia questi materiali venivano degradati per via dell'attrito presente nelle articolazioni e non potevano fornire una lubrificazione a lungo termine. Successivamente venne risposto interesse in biomateriali che promuovono la rigenerazione della cartilagine. Gli idrogel possiedono tutte le caratteristiche necessarie per essere matrici di supporto ideali per la rigenerazione cartilaginea. Gli idrogel offrono la possibilità di avere una struttura simile all'ECM necessaria per poter ospitare cellule, inoltre garantiscono: proprietà meccaniche, biocompatibilità e porosità adeguata.

Nel caso della cartilagine, le principali fonti cellulari sono: condrociti e cellule staminali. In aggiunta, per aumentare la crescita del tessuto cartilagineo, è necessario aggiungere alle matrici di supporto anche i fattori di crescita, che si legano ai recettori superficiali cellulari e attivano le vie di segnalazione intracellulare, che a loro volta – come detto in precedenza - influenzano la proliferazione cellulare, la differenziazione e la sintesi dell'ECM durante la rigenerazione dei tessuti [17,22].

Il problema principale dell'applicazione degli idrogel nella cartilagine articolare è il trasporto dell'idrogel fino ad arrivare allo strato più profondo della cartilagine. In questo caso, gli idrogel hanno grandi dimensioni, bassa superficie specifica, mancanza di micropori e bassa velocità di degradazione. Per questo motivo vengono spesso introdotti i microgel a base di idrogel che, con dimensioni comprese tra 10 nm e 100 μ m, possono attraversare le membrane biologiche. Gli idrogel a base di microgel sono considerati trasportatori ideali per farmaci, liposomi e peptidi [23].

I polimeri sintetici sono comunemente usati nella progettazione di idrogel poiché possiedono proprietà chimiche e fisiche controllate, oltre ad una elevata resistenza meccanica. Inoltre

creando idrogel attraverso la reazione con le basi di Schiff, che si basa sull'aggiunta nucleofila di un'ammina all'aldeide/chetone, si ottengono idrogel biodegradabili.

Nello studio condotto da Shuang et al., [24] è stato preparato un idrogel iniettabile prodotto tramite una reazione con basi di Schiff tra PLGA-ADH (acido poli-lattico-co-glicolico modificato da acido adipico diidrazide) e PEG-CHO (glicole polietilenico con gruppi terminali costituiti da benzaldeide). Gli idrogel a base di PLGA e PEG, reticolati tramite reazione di Schiff hanno mostrato una grande capacità di autoguarigione; inoltre possiedono una buona compatibilità con cellule staminali mesenchimali derivate dal midollo osseo (BMSC) e quindi ne possono sostenere efficacemente la proliferazione [24].

Negli esperimenti in vivo un difetto cartilagineo è stato costruito in un modello di ratto per valutare l'effetto dell'idrogel PLGA/PEG nella rigenerazione della cartilagine [24]. Analizzando i risultati 4 settimane dopo l'operazione, è stato riportato che il gruppo di ratti dove è stato iniettato l'idrogel ha ottenuto una significativa rigenerazione cartilaginea, invece nel gruppo di ratti senza idrogel è rimasto un difetto non rigenerato fino a 8 settimane dopo l'operazione [24]. Comunque dopo 8 settimane il gruppo idrogel ha presentato una migliore rigenerazione della cartilagine con un abbondante e continuo riempimento dei difetti e una buona integrazione con il tessuto circostante. Pertanto gli idrogel a base di PLGA/PEG hanno promosso significativamente la riparazione dei difetti della cartilagine. Inoltre gli idrogel a base di PLGA/PEG potendo sostenere al loro interno le cellule BMSC possono migliorare anche l'espressione genica specifica della cartilagine [24].

La cartilagine articolare svolge il ruolo di lubrificante per poter permettere il movimento delle articolazioni. Una sfida è riuscire a produrre un idrogel in grado di mimare le proprietà meccaniche e lubrificanti della CA.

Grazie ad una collaborazione scientifica tra l'Istituto di BioRobotica della Scuola Superiore Sant'Anna e l'Istituto Ortopedico Rizzoli è stato creato un idrogel a doppio strato che imita le caratteristiche della cartilagine articolare e consente di ripristinarne le proprietà naturali nelle zone in cui il tessuto è degenerato [2*]. La ricerca ha avuto come obiettivo quello definire una possibile strategia di intervento per la risoluzione di problemi articolari che riguardano il ginocchio, tramite l'uso di un materiale funzionale al recupero delle proprietà meccaniche e lubrificanti della cartilagine articolare danneggiata a seguito di traumi o osteoartrite [2*]. Durante la ricerca è stato prodotto un idrogel a due strati composto da gomma gellan (GG) e polietilene glicole diacrilato (PEGDA) drogato con ossido di grafene: l'idrogel è in grado di imitare le caratteristiche meccaniche e di lubrificazione delle zone profonde e superficiali della cartilagine. La gomma gellan è un polisaccaride anionico solubile in acqua prodotto dal batterio

Sphingomonas elodea, possiede le proprietà di biocompatibilità e biodegradabilità, il suo uso nella rigenerazione della cartilagine è per via della sua somiglianza con i glicosamminoglicani in virtù della presenza di residui di acido ialuronico nella sua unità ripetitiva. L'ossido di grafene viene aggiunto per ridurre l'attrito nello strato superficiale dell'idrogel e anche perché possiede proprietà condroinduttive quando viene incorporato in formulazioni polimeriche. Durante i test in vitro non sono stati riscontrati effetti citotossici sui condrociti fino a 6 giorni, dimostrando la sicurezza dell'idrogel a due strati [25]. Inoltre tramite un test di usura è stato confermato che l'idrogel può resistere a sollecitazioni fisiologicamente rilevanti fino a 100000 cicli.

La conclusione dello studio ha dimostrato che l'idrogel risultante è in grado di riprodurre efficacemente le proprietà meccaniche degli strati superficiali e profondi della cartilagine articolare, ponendosi come possibile sostituto sintetico da somministrare in modo minimamente invasivo per ripristinare le proprietà funzionali della cartilagine [25].

3.5 Tecniche avanzate per la produzione di idrogel utilizzabili nel tessuto osteocondrale e cartilagineo

La giunzione osteocondrale comprende la regione tra gli strati più profondi della cartilagine articolare e l'osso sottostante. Il compartimento osteocondrale, come rappresentato nella Figura 3.4, comprende la cartilagine profonda non calcificata, il tidemark, la cartilagine calcificata e l'osso subcondrale [26,27]. I difetti all'interfaccia osteocondrale coinvolgono comunemente lesioni sia nella cartilagine articolare sia nell'osso sottostante subcondrale e sono causati da malattie, traumi e invecchiamento [26,27].

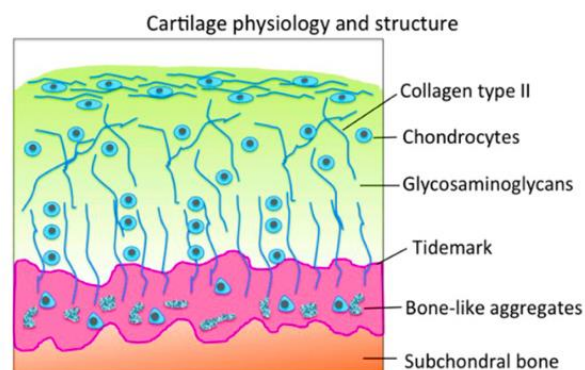


Figura 3.4: illustrazione schematica della anatomia della giunzione osteocondrale: primo strato di cartilagine non calcificata che contiene collagene di tipo II, condrociti e glicosamminoglicani, tidemark che separa la cartilagine non calcificata da quella calcificata, cartilagine calcificata e osso subcondrale.

La sfida principale nel costruire idrogel iniettabili nel giunto osteocondrale è quella di creare architetture altamente stratificate e biomimetiche. Grazie alle tecniche di produzione avanzate per la creazione di idrogel si può affrontare questo problema. Le principali tecniche sono: bio-fabbricazione microfluidica, 3D-bioprinting, e 3D-assemblaggio.

La fabbricazione microfluidica produce idrogel stratificati con all'interno incapsulati gradienti di cellule e fattori di crescita. Questa tecnica è ottimale per produrre tessuti con geometrie semplici e di piccole dimensioni, non è in grado di realizzare prodotti 3D con strutture anatomiche complesse.

Il 3D-bioprinting è una tecnologia promettente in grado di ottenere strutture 3D complesse, si realizza mediante un processo di deposizione multistrato di bioinchiostri e cellule. Attraverso il 3D-bioprinting vengono prodotti idrogel di fibroina di seta e gelatina contenenti cellule staminali mesenchimali, ma anche idrogel a base di alginato. Entrambi mostrano una buona vitalità a lungo termine utile per favorire la crescita del tessuto cartilagineo. Normalmente lo spessore dei prodotti da 3D-bioprinting è limitato a causa dell'insufficiente supporto strutturale. Un nuovo sistema di 3D-bioprinting è riuscito a stampare idrogel contenenti cellule con l'aggiunta di altri polimeri che forniscono integrità strutturale. Tale piattaforma può produrre tessuti/organi clinicamente utili che combinano biofunzioni e stabilità strutturale [27].

La tecnica del 3D-bioprinting presenta alcune sfide che possono limitarne l'utilizzo clinico, ovvero: i costrutti potrebbero mancare della resistenza meccanica necessaria per mantenere la loro forma, la risoluzione bassa di biomateriali rende difficile fabbricare costrutti su scala micro/nanometrica e il tempo di elaborazione per la produzione della biostampa può essere troppo elevato.

La tecnologia di 3D-assemblaggio può essere utilizzata per risolvere i problemi che vengono a crearsi quando gli idrogel una volta inseriti in situ perdono la loro forma originale per via del loro rigonfiamento: questo porta ad una diminuzione della capacità di supportare i carichi meccanici. Questa tecnologia viene anche detta "*3D puzzle assembling technology*" perché permette di realizzare idrogel su larga scala assemblando vari idrogel insieme come se fossero appunto un puzzle. In questo modo vengono risolte le difficoltà associate al ridimensionamento potendo assemblare vari idrogel insieme invece di dover creare un solo supporto [27].

Una nuova tecnologia di assemblaggio 3D è stata sviluppata per produrre idrogel ingegnerizzati per il tessuto cartilagineo a base di agarosio che mostrano un miglioramento nelle proprietà meccaniche e biochimiche [27]. Infatti, le strutture assemblate hanno riportato un modulo di Young quattro volte maggiore, riuscendo a resistere a grandi sforzi di compressione.

Capitolo 4: Applicazioni di idrogel per la rigenerazione del tessuto nervoso

4.1 Il ruolo degli idrogel conduttivi nella rigenerazione del tessuto nervoso

Il tessuto nervoso ha la funzione di ricevere, trasmettere ed elaborare stimoli; è formato da due tipi principali di cellule: i neuroni e la neuroglia. I neuroni sono le unità strutturali e funzionali del sistema nervoso, ogni neurone costituisce un centro di regolazione e di integrazione degli impulsi provenienti da moltissime altre cellule nervose [28]. I neuroni hanno una conformazione particolare con lunghi processi che si originano dal corpo cellulare: se questi processi ricevono segnali in arrivo dall'esterno, vengono chiamati dendriti; se invece trasportano segnali in uscita, vengono detti assoni.

Le cellule nervose possiedono le proprietà di irritabilità e conducibilità. L'irritabilità è la capacità di trasformare gli stimoli provenienti dall'ambiente esterno in impulsi nervosi; la conducibilità è la capacità di trasmettere i segnali nervosi ad altre parti della stessa cellula, ad altri neuroni ed alle cellule effettrici [28].

La regione in cui un terminale assonico incontra una cellula bersaglio è chiamata sinapsi. Nella maggior parte dei casi, i neuroni rilasciano segnali chimici, detti neurotrasmettitori, nel liquido extracellulare per comunicare con le cellule vicine [29].

Il sistema nervoso può essere suddiviso in due parti: sistema nervoso centrale costituito da cervello e midollo spinale, e sistema nervoso periferico costituito da neuroni sensoriali afferenti ed efferenti [29].

Le malattie neurodegenerative, ad esempio l'Alzheimer, il morbo di Parkinson, la sclerosi laterale amiotrofica e la lesione del midollo spinale, rappresentano una grande problema in tutto il mondo e hanno un'incidenza crescente dato che l'età media della popolazione è in aumento [30]. Le malattie neurodegenerative vengono spesso considerate come patologie cliniche separate perché hanno sintomi diversi e colpiscono diverse aree cerebrali. Tuttavia condividono caratteristiche comuni a livello genetico, molecolare e cellulare come, ad esempio, l'aggregazione e il malfunzionamento di specifiche proteine, la disfunzione vascolare precoce e l'attivazione delle risposte immunitarie [30]. La causa esatta di queste malattie è ancora sconosciuta e ad oggi esistono soltanto trattamenti sintomatici: per questo motivo, la ricerca si è concentrata sui biomateriali, non solo per lo studio della patologia ma anche per la loro applicazione in medicina rigenerativa. I biomateriali possono essere utilizzati come supporto per la crescita e proliferazione cellulare e come vettori per fornire molecole attive nel trattamento di disturbi neurodegenerativi [30].

Poiché la caratteristica fondamentale del tessuto nervoso è quella di trasmettere segnali elettrici, l'ingegneria tessutale si è sempre concentrata su materiali in grado di favorire la conduzione elettrica.

I primi biomateriali studiati erano a base di: carbonio, grafene e particelle metalliche come, ad esempio, l'oro. Le loro applicazioni nell'ingegneria tessutale venivano studiate poiché questi biomateriali possedevano due importanti proprietà: favorire la conduttività elettrica e avere una forte resistenza in trazione. Tuttavia diversi svantaggi, tra i quali: la non biodegradabilità, i problemi di incerta tossicità in vivo a lungo termine e la distribuzione disomogenea delle particelle conduttrici in un sistema composito, hanno limitato il loro uso [31].

Successivamente la ricerca si è concentrata sui polimeri conduttori. I polimeri conduttori (PC) si presentano come una nuova generazione di materiali organici, possiedono proprietà elettriche o ottiche simili a metalli e semiconduttori inorganici, ma mostrano anche altre proprietà ovvero facilità di sintesi, flessibilità nella lavorazione, biocompatibilità, possibilità di controllare proprietà chimiche e fisiche mediante tecniche di funzionalizzazione superficiale o attraverso l'uso di una grande gamma di molecole che possono essere inserite o utilizzate come droganti. I PC più importanti usati nell'ingegneria tessutale nervosa sono polianilina, polipirrolo, politiofene e i loro derivati compositi [31]. I PC possono promuovere attività cellulari tra cui l'adesione, la migrazione, la proliferazione, la differenziazione e la secrezione cellulare [31].

Per migliorare la biocompatibilità è possibile incorporare materiali e polimeri conduttori all'interno degli idrogel creando quindi idrogel conduttivi, i quali offrono sia la possibilità di avere una struttura simile all'ECM, ma anche di poter essere facilmente somministrati attraverso iniezione. Gli idrogel conduttivi (IC) combinano le proprietà biomimetiche degli idrogel con le proprietà elettrochimiche dei materiali conduttivi [32]. Gli IC sono utilizzabili per il rilevamento di segnali generati nei sistemi biologici e forniscono una stimolazione elettrica per regolare le attività e le funzioni delle cellule e dei tessuti [32]. Gli IC migliorano i comportamenti cellulari attraverso le attività chimiche e biologiche dei materiali conduttori e forniscono un ambiente appropriato per la rigenerazione del tessuto nervoso [32].

I principali materiali conduttivi usati per creare gli IC sono materiali a base di carbonio, polimeri conduttori e particelle metalliche.

Grazie alla buona stabilità ambientale, elevata conduttività e bassi costi di produzione, i materiali a base di carbonio sono considerati ideali per la preparazione degli IC. In particolare il grafene è utilizzato sia per garantire una buona conduttività, ma anche per favorire una rigenerazione tessutale promuovendo una forte adesione cellulare [32].

I polimeri conduttori offrono una grande capacità conduttiva, tuttavia possiedono una certa idrofobicità poiché nella loro struttura sono presenti anelli aromatici. Per questo motivo vengono combinati con idrogel, che riescono a rendere il sistema finale idrofilico e iniettabile in situ.

I materiali metallici hanno un'alta conduttività, interessanti proprietà ottiche e sono facili da produrre. Gli idrogel a base di particelle metalliche riescono a sviluppare in situ le proprietà dei materiali metallici mantenendo comunque una struttura biocompatibile e simile all'ECM.

Attualmente sono stati fabbricati idrogel con diverse strutture e composizioni. Poiché gli idrogel vengono utilizzati prevalentemente nella forma iniettabile, sono stati prodotti idrogel iniettabili, conduttivi e degradabili a base di polianilina e gelatina. Il polimero viene sintetizzato innestando la polianilina su una catena principale a base di gelatina. La scelta della gelatina è dovuta al fatto che è il polimero naturale più propenso alla formazione di un gel in situ e ovviamente più alta è la percentuale di polianilina più l'idrogel risulta conduttivo [31,32].

Un ulteriore IC viene preparato usando chitosano, un polimero naturale, e polianilina e la sua sintesi avviene sfruttando la reazione di Schiff che consente di ottenere idrogel iniettabili biodegradabili [31].

Gli idrogel conduttivi possono essere sintetizzati attraverso processi chimici o fisici. Una complicazione presente nell'uso di idrogel conduttori sintetizzati chimicamente è quella che spesso possono contenere monomeri residui o agenti di reticolazione tossici, come ad esempio glutaraldeide o isocianato. Per questo motivo vengono preferiti gli idrogel sintetizzati attraverso la formazione di reticolazioni fisiche, poiché garantiscono una maggiore biocompatibilità.

4.2 Applicazioni di idrogel nella riparazione delle lesioni al midollo spinale

4.2.1 Lesione al midollo spinale: trattamenti attuali

La lesione al midollo spinale è una condizione neurologica che porta alla perdita delle funzioni sensoriali e motorie. Può causare ad altri problemi significativi come: la disfunzione della vescica e dell'intestino, infezioni, dolore cronico e problemi cardiaci e respiratori. La lesione al midollo spinale si verifica principalmente a seguito di un evento traumatico, ma può anche essere causata da infiammazioni e tumori. La lesione raramente provoca la rottura completa del tessuto nel sito della lesione, infatti circa il 61% delle lesioni sono classificate come incomplete, quindi esiste ancora una certa funzionalità nel tessuto da poter sfruttare nelle terapie volte alla rigenerazione.

La lesione al midollo spinale può essere suddivisa in tre fasi: lesione primaria, lesione secondaria e condizione cronica (Figura 4.1). La lesione primaria si manifesta nei primi sette

giorni dopo l'evento traumatico, la lesione secondaria si sviluppa tra 7-14 giorni dopo il trauma e la fase cronica può avvenire mesi o anni dopo la lesione. La lesione primaria è caratterizzata da danni irreversibili causati da forze esterne che agiscono (direttamente o indirettamente) sul midollo spinale; le caratteristiche fisiopatologiche includono edema, danno cellulare, stress ossidativo, apoptosi e necrosi tessutale [33]. La lesione secondaria si riferisce ad ulteriori danni causati dalla compressione del midollo spinale, rilascio di citochine, eccessiva proliferazione di astrociti e microglia e accumulo di macrofagi nel sito [33]. La lesione secondaria può portare ad una condizione cronica nella quale si hanno danni permanenti ai tessuti e alla loro funzione, influenzando la riparazione dei nervi e complicando la ricostruzione della sinapsi neuronale. La cicatrice che si forma a seguito della lesione è composta da lunghi processi astrocittici, che formano una rete densa nella quale macrofagi, fibroblasti e cellule di Schwann si inseriscono. Nella fase cronica la cicatrice astrocittica si stabilizza e si estende lungo il percorso degli assoni degenerati. Dato che i fibroblasti si inseriscono nella cicatrice potrebbero formare un'ulteriore cicatrice a base di collagene, che rappresenta una barriera per la rigenerazione. Infatti una cicatrice a base di collagene ha una struttura densa e possiede la capacità di legare molecole inibitorie della crescita cellulare.

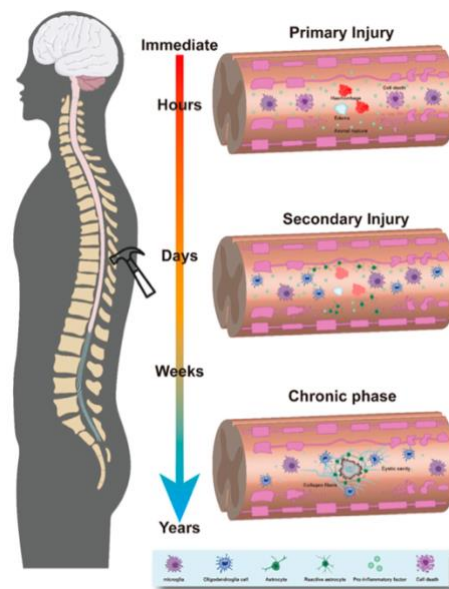


Figura 4.1: Le tre fasi principali della lesione al midollo spinale. La lesione primaria si sviluppa a partire dall'evento traumatico e prosegue per alcuni giorni provocando edema, emorragia e morte cellulare. Successivamente si sviluppa la lesione secondaria e si presentano astrociti che formeranno la cicatrice nel sito della lesione. Nella terza fase è presente la situazione cronica. Nel riquadro in basso nella figura è presente una legenda dei vari tipi di cellule che sono presenti nelle diverse fasi. Nella lesione primaria sono presenti le microglia, nella lesione secondaria e nella fase cronica sono presenti: microglia, oligodendroglia e astrociti reattivi.

I trattamenti attualmente disponibili per la lesione al midollo spinale sono limitati e comprendono principalmente approcci chirurgici e farmacologici. Questi tipi di trattamenti

hanno l'obiettivo di ricostruire strutturalmente il midollo spinale, inibire la cicatrizzazione degli astrociti, promuovere la rigenerazione delle cellule nervose, regolare la distribuzione della matrice extracellulare e rimodellare i neuroni danneggiati e la loro conduzione [33]. Il metodo chirurgico decomprime la colonna vertebrale compressa, migliora la neuroprotezione in prossimità della lesione, e ripristina la stabilità della colonna vertebrale; tuttavia il problema del trattamento chirurgico è il fatto di essere altamente invasivo.

Le cure farmacologiche migliorano la funzione neurologica nei pazienti riducendo la produzione di sostanze infiammatorie nel sito della lesione; però la somministrazione endovenosa può portare a fenomeni di infezione nel sito della ferita. Inoltre, i metodi di somministrazione tradizionali, ovvero via endovenosa e orale, sono ostacolati dal sistema delle membrane che costituisce le meningi e quindi non producono l'effetto desiderato poiché non riescono a portare il farmaco nel sito desiderato.

Per favorire una rigenerazione tessutale serve una matrice che funge da vettore per somministrazione di cellule e fattori attivi, garantendo la sopravvivenza e proliferazione cellulare e promuovendo la riconnessione e rigenerazione del tessuto del midollo spinale danneggiato [33]. Una tra le matrici più utilizzate per la rigenerazione del tessuto nervoso è rappresentata dagli idrogel.

4.2.2 Idrogel per il trattamento di lesioni al midollo spinale

L'uso di idrogel permette di fornire supporto meccanico a cellule e tessuti, promuovere la migrazione cellulare e facilitare il rilascio controllato a lungo termine di cellule e farmaci, favorendo così la riparazione e la rigenerazione del tessuto spinale.

Gli idrogel possono trasportare le cellule in due modi differenti. Il primo modo consiste nella produzione di un idrogel che funge da vettore per cellule, fattori di crescita e farmaci, garantendo un microambiente adatto per la ricostruzione neuronale. L'idrogel prodotto con all'interno le varie cellule o e/o fattori viene iniettato nel sito lesionato, andando a riempire direttamente i difetti dovuti alle lesioni del midollo spinale e fornendo un supporto per la rigenerazione degli assoni. Il secondo modo prevede di impiantare le cellule dopo la preparazione della matrice: questa tecnica è svantaggiosa poiché le cellule non saranno distribuite uniformemente nello spazio della matrice e quindi non viene garantita una rigenerazione uniforme.

Le cellule principalmente usate nella riparazione della lesione al midollo spinale sono le cellule dell'epitelio olfattivo, le cellule di Schwann, le cellule staminali neuronali, in alcuni studi anche le cellule embrionali, le cellule pluripotenti indotte e le cellule staminali mesenchimali. Le cellule staminali trapiantate possono differenziarsi in cellule neuronali e in cellule gliali:

quest'ultime secernono varie citochine che inibiscono l'infiammazione e l'apoptosi, promuovono la rigenerazione assonale e ripristinano la comunicazione interneuronica. Gli idrogel contenenti le cellule staminali neuronali promuovono la differenziazione dei neuroni, sostituendo i neuroni morti e ripristinando la conduzione nervosa; possono anche inibire la risposta infiammatoria e ridurre il grado di demielinizzazione degli assoni danneggiati.

Per la cura della lesione al midollo spinale vengono usati idrogel naturali come quelli a base di collagene, gelatina, acido ialuronico, fibrina, chitosano, alginato, agarosio, laminina e fibronectina.

Il collagene può promuovere la proliferazione e differenziazione delle cellule nervose; inoltre, idrogel di collagene impiantati promuovono la migrazione delle cellule nervose, la crescita e la rigenerazione degli assoni nervosi e la secrezione del fattore neurotrofico derivato dal cervello (BDNF) e della neurotrofina-3 (NT-3). Negli idrogel a base di collagene la disposizione delle fibre è importante per guidare l'orientamento e la migrazione delle cellule: la direzione delle fibre può essere controllata usando nanoparticelle magnetiche e applicando un campo magnetico esterno durante la produzione dell'idrogel in modo da indirizzare le fibre nella direzione desiderata.

Gli idrogel a base di alginato mostrano una buona biocompatibilità e vengono usati come vettori iniettabili per trasportare nel sito della lesione farmaci o citochine; inoltre, l'alginato può essere reticolato e formare un gel reticolato che funge da volume di crescita tridimensionale per le cellule [33].

L'acido ialuronico è il componente principale dell'ECM del sistema nervoso centrale, può ridurre le risposte infiammatorie, inibire la formazione di cicatrici e promuovere l'angiogenesi. L'acido ialuronico è spesso combinato con altri materiali per costruire un idrogel composito; ad esempio, creando una reticolazione tra acido ialuronico e tioli, si può ottenere una rigenerazione assonale sfruttando le alte proprietà adesive dall'acido ialuronico e la prevenzione di neurotossicità garantita dai tioli.

Il polisaccaride più comunemente usato nella produzione di idrogel è il chitosano che presenta un'ottima biocompatibilità e bassa risposta immunitaria. Il chitosano può essere utilizzato per la produzione di stent per condurre esperimenti *in vivo* per la riparazione della lesione al midollo spinale. Inoltre l'idrogel di chitosano oltre a promuovere la ricostruzione del tessuto spinale, riesce ad indurre anche la crescita di vasi sanguigni [33].

Oltre agli idrogel naturali possono essere utilizzati anche idrogel sintetici, i più usati sono PEG, PCL, PLA, PLLA e loro copolimeri. Il PEG può essere utilizzato per fornire cellule staminali mesenchimali del midollo osseo e promuovere la riparazione della lesione ai nervi. Il

policoprolattone (PCL) promuove la neurogenesi endogena e il recupero funzionale dei circuiti di trasmissione dei segnali interrotti; il PCL può promuovere la differenziazione delle cellule staminali neuronali e favorire la formazione della guaina mielinica assonale. Un'ulteriore alternativa potrebbe essere quella di usare il copolimero PLA-PEG-PLA contenente NT-3 che, dopo l'iniezione in vivo nel midollo spinale, è in grado di mantenere una somministrazione sostenuta del fattore neurotrofico per un periodo di due settimane, inoltre questo copolimero è anche in grado di incapsulare cellule neuronali [34].

4.3 Applicazioni di idrogel nella riparazione delle lesioni ai nervi periferici

4.3.1 Lesione ai nervi periferici: principali approcci terapeutici

Il sistema nervoso periferico (SNP) collega il sistema nervoso centrale con il resto del corpo attraverso nervi motori e sensoriali. Il sistema nervoso periferico è ulteriormente diviso in sistema nervoso autonomo e sistema nervoso somatico. Il sistema nervoso autonomo si occupa dei muscoli lisci degli organi interni e delle ghiandole, mentre il sistema nervoso somatico regola i movimenti volontari e capta informazioni dagli organi di senso [3*].

Il sistema nervoso periferico è principalmente composto da nervi cranici, nervi spinali e nervi periferici nonché da organi e muscoli collegati ai vari nervi. I nervi periferici agiscono come canali che trasmettono informazioni sensoriali dal sistema nervoso centrale verso i muscoli e le ghiandole in tutto il corpo.

Nel SNP si trovano principalmente le cellule neuronali, ma sono presenti anche le cellule gliali che forniscono stabilità strutturale ai neuroni avvolgendosi attorno ad essi, e le cellule di Schwann che forniscono supporto e isolamento agli assoni producendo mielina, una sostanza che è formata da strati multipli concentrici di membrana fosfolipidica. La mielina agisce come isolante intorno agli assoni e accelera la trasmissione dei segnali nel tessuto nervoso.

Le lesioni ai nervi periferici possono essere causate da traumi, infezioni, malattie autoimmuni, alcol, tossine e anche da alcuni tipi di farmaci usati in modo inappropriato. Le lesioni al SNP provocano disfunzionalità permanenti poiché avviene una disconnessione del sistema nervoso centrale dagli arti. A causa delle lesioni nervose periferiche si verifica una cascata di eventi che coinvolge le cellule di Schwann, fibroblasti, cellule endoteliali e macrofagi; queste reazioni portano ad un ulteriore peggioramento della lesione. A seguito della lesione vengono reclutati macrofagi nel sito per eliminare residui mielinici e tessuto necrotico. I macrofagi, se sono presenti in eccesso, ostacolano il ripristinarsi delle condizioni precedenti alla lesione poiché aumentano il rilascio di fattori pro-infiammatori che portano ad un aumento di ROS (Reactive Oxygen Species) nei tessuti, che inibiscono la crescita del nervo periferico. Se il muscolo

rimane denervato per molto tempo, si arriverà alla paralisi e successivamente all'atrofia muscolare. Pertanto è necessario adottare trattamenti che riescano a rigenerare il nervo periferico e contemporaneamente siano in grado di riconnettere i nervi periferici lesionati con gli organi bersaglio nel più breve tempo possibile.

Le terapie attualmente presenti per rigenerare i nervi periferici sono sostanzialmente due: il trapianto chirurgico di nervo autologo e l'utilizzo di biomateriali. Anche se la scelta ottimale sarebbe l'applicazione di materiali autologhi, la disponibilità limitata, le complicazioni legate al prelievo di tessuti, la formazione di tessuto cicatriziale e la scarsa potenzialità di rigenerazione limitano ampiamente l'utilizzo della pratica chirurgica. Infatti, potrebbero esserci successivamente formazioni di neuomi, morbilità del sito del donatore e possibili risposte immunologiche. Quindi è preferibile utilizzare biomateriali che comportano meno rischi per il paziente.

L'obiettivo principale dell'ingegneria tessutale è sviluppare matrici bioattive simili al tessuto nervoso nativo, che siano in grado di rigenerare la lesione ai nervi periferici e migliorare le funzioni del tessuto nervoso danneggiato. I sostituti del tessuto nervoso devono possedere caratteristiche biologiche, chimiche e fisiche che simulino il microambiente cellulare poiché svolgono un ruolo essenziale nel controllare la proliferazione, la migrazione, la differenziazione delle cellule neuronali e la rigenerazione del tessuto nervoso.

Le strategie tradizionali di ingegneria tessutale si sono concentrate su trattamenti delle lesioni neuronali impiantando neuroguide a base di biomateriali naturali o sintetici. Le neuroguide fungono da ponte tra i ceppi di entrambi i lati del nervo lesionato e forniscono supporto strutturale e favoriscono la rigenerazione degli assoni circostanti lungo il condotto. Tuttavia, questi sistemi presentano scarsa flessibilità con conseguente rischio di rottura locale del moncone nervoso.

Gli idrogel presentano le giuste proprietà fisiche per poter essere iniettati nel tessuto nervoso dei nervi periferici poiché la loro natura viscoelastica porosa gli permette di far aderire, proliferare e migrare le cellule neuronali e fattori di crescita. La ricerca sugli idrogel per la rigenerazione dei nervi periferici si concentra su quattro tipologie di impianti, come illustrato nella Figura 4.2, cioè: idrogel conduttivi, idrogel con fattori di crescita in grado di stimolare la differenziazione delle cellule staminali, idrogel con all'interno cellule staminali e idrogel a base di peptidi autoassemblanti.

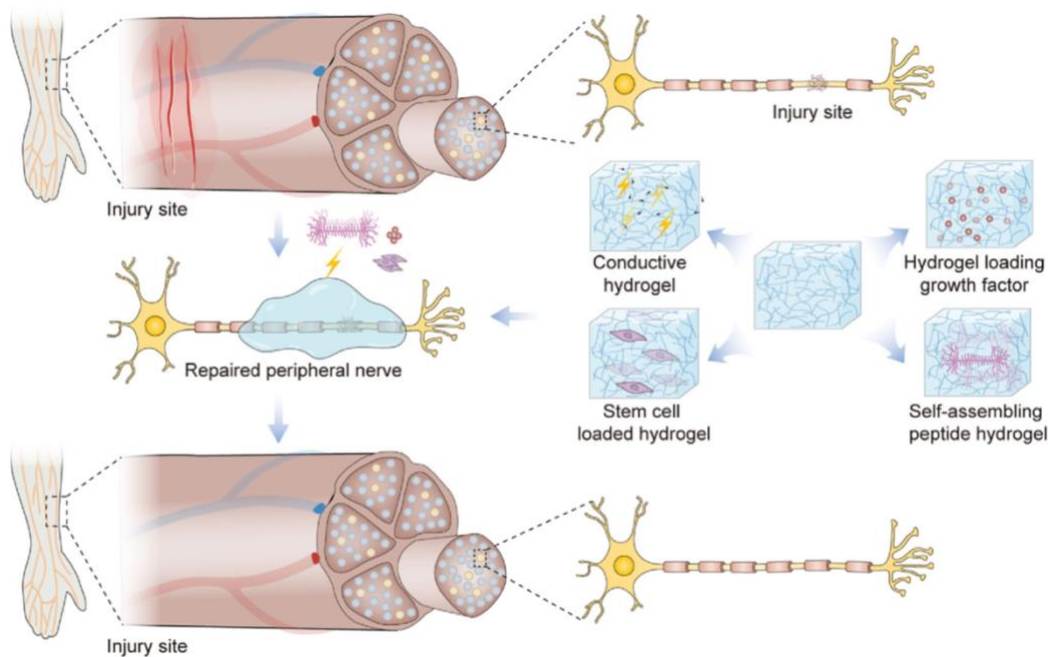


Figura 4.2: Le quattro tipologie di idrogel usate nella rigenerazione del tessuto nervoso a seguito di lesione ai nervi periferici. Possono essere usati: idrogel conduttivi, idrogel contenenti fattori di crescita, idrogel contenenti cellule staminali e idrogel a base di peptidi autoassemblanti.

4.3.2 *Idrogel contenenti cellule staminali o fattori di crescita nella rigenerazione dei nervi periferici*

Dopo una lesione ai nervi periferici, le cellule staminali sono le uniche cellule in grado di promuovere la proliferazione cellulare e secernere fattori neurotrofici, che successivamente cooperano per ottenere una rigenerazione neuronale. Il problema delle cellule staminali è che sono difficili da ottenere e da coltivare, per questo motivo il loro uso è limitato [35]. Gli idrogel possono essere usati come supporto per garantire una maggiore vitalità alle cellule staminali in situ.

Per la rigenerazione dei nervi periferici si possono usare diversi tipi di cellule staminali:

1. cellule staminali embrionali: sono cellule pluripotenti presenti durante lo sviluppo embrionale, hanno un'alta capacità di differenziazione, tuttavia le problematiche etiche correlate al loro uso ne limitano l'utilizzo;
2. cellule staminali mesenchimali ottenute dal tessuto adiposo: possono essere ottenute tramite tecniche minimamente invasive e possiedono una percentuale di differenziazione più alta rispetto alle cellule mesenchimali ottenute dal tessuto osseo;
3. cellule staminali mesenchimali ossee: promuovono la rigenerazione dei nervi periferici poiché si differenziano in neuroni e astrociti; inoltre contribuiscono alla promozione dell'angiogenesi;

4. cellule staminali olfattive: sono presenti nella mucosa nasale e sono prontamente disponibili; possiedono una tendenza più naturale nel differenziarsi in cellule neuronali e gliali. Possono secernere vari fattori neurotrofici come, ad esempio, il fattore neurotrofico ciliare e il fattore neurotrofico derivato dal cervello, che vengono utilizzati per migliorare la rigenerazione dei nervi periferici danneggiati.

I fattori di crescita hanno un ruolo fondamentale nella rigenerazione dei nervi periferici e nel recupero funzionale del tessuto. Il loro ruolo si manifesta migliorando le interazioni con le cascate di segnalazione molecolare presenti all'interno e tra le cellule. I fattori di crescita promuovono la migrazione delle cellule staminali, la rigenerazione degli assoni, la rigenerazione della mielina e la riconnessione dei bersagli adiacenti durante la riparazione dei nervi [35]. A seguito della lesione non ci sono abbastanza fattori di crescita in situ e se questa condizione non viene modificata porta alla successiva morte di molte cellule neuronali. Per evitare la morte cellulare, i fattori di crescita devono essere somministrati dall'esterno e per farlo vengono usati gli idrogel come supporti per il trasporto [35]. Negli idrogel possono essere inseriti numerosi fattori di crescita:

1. fattore di crescita dei fibroblasti (FGF): accelera la proliferazione delle cellule staminali e dei neuroni e promuove l'angiogenesi, la mielinizzazione e la rigenerazione sinaptica;
2. fattore neurotrofico derivato dalle cellule gliali (GDNF): supporta la sopravvivenza e la crescita dei motoneuroni e dei neuroni sensoriali primari;
3. fattore neurotrofico derivato dal cervello (BDNF): è importante per la proliferazione, differenziazione e migrazione delle cellule staminali neuronali;
4. fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF): induce la neurovascolarizzazione, aumenta il tasso di proliferazione delle cellule endoteliali vascolari e protegge la sopravvivenza dei neuroni.

4.3.3 Idrogel conduttivi nella rigenerazione dei nervi periferici

Le cellule neuronali possono trasmettere segnali elettrici lungo gli assoni quindi i sostituti del tessuto nervoso dovrebbero possedere conduttività elettrica per simulare le caratteristiche dell'ECM per regolare le attività fisiologiche delle cellule e la rigenerazione nervosa. Sebbene il meccanismo secondo cui la stimolazione elettrica promuova la rigenerazione neuronale non sia completamente compreso, studi recenti hanno dimostrato che i cambiamenti della polarità nelle molecole della matrice extracellulare e il rilascio di alcuni fattori neurotrofici dipendano entrambi dalla stimolazione elettrica [36].

Gli idrogel conduttivi, possedendo la proprietà di conducibilità, sono adatti nell'ingegneria dei tessuti neurali. Gli IC per la rigenerazione dei nervi periferici possono essere prodotti mediante l'aggiunta di polimeri conduttori o di materiali conduttivi a base di carbonio. I principali polimeri conduttivi usati per la rigenerazione dei nervi periferici sono: polipirrolo, polipolistirene sulfonato (PEDOT) e polianilina [36]. Questi polimeri, oltre ad avere una buona conduttività, presentano anche una buona biocompatibilità che gli permette di ottenere una rigenerazione del tessuto neuronale. I materiali conduttivi a base di carbonio e grafene vengono integrati in idrogel per fornire conducibilità elettrica e termica e stabilità chimica [36].

4.3.4 Idrogel a base di peptidi autoassemblanti

I polipeptidi autoassemblanti (Self-assembled peptide, SAPs) sono peptidi sintetici che, in condizioni di equilibrio termodinamico si autoassemblano in nanostrutture altamente ordinate. I SAP possono essere reticolati in modi diversi per formare idrogel non tossici, biologicamente funzionali, che possono essere usati come trattamento alternativo per le lesioni ai nervi periferici poiché presentano una grande biocompatibilità e proprietà adesive. I SAP possono essere modificati in soluzione per formare idrogel con una struttura tridimensionale simile a quella del tessuto nervoso; possono essere inoltre utilizzati come matrici per la coltura di cellule nervose. Poiché i SAP sono composti da amminoacidi naturali, i loro prodotti sono piccoli amminoacidi che non causano problemi di rigetto immunitario e citotossicità [35,37].

Negli idrogel a base di SAP il contenuto d'acqua è superiore al 99%, quindi presentano un buon rapporto di ritenzione idrica e rigonfiamento [37]. Inoltre, la realizzazione di questi idrogel è semplice poiché la sequenza peptidica può essere creata artificialmente e poi successivamente inserita nell'idrogel.

Gli idrogel a base di SAP svolgono un ruolo importante nella differenziazione mirata delle cellule staminali e anche nella mielinizzazione degli assoni periferici lesionati; inoltre, se vengono caricati con cellule nervose garantiscono un alto tasso di sopravvivenza delle stesse [35,37].

Le sequenze peptidiche comunemente utilizzate per la creazione di scaffolds a base di polipeptidi autoassemblanti per la rigenerazione delle lesioni nervose sono IKVAV (isoleucina-lisina-valina-alanina-valina), RGD (arginina-glicina-acido aspartico), YIGSR (tirosina-isoleucina-glicina-serina-arginina) e RADA16 (arginina-alanina-acido aspartico-alanina) rappresentate nella Figura 4.3.

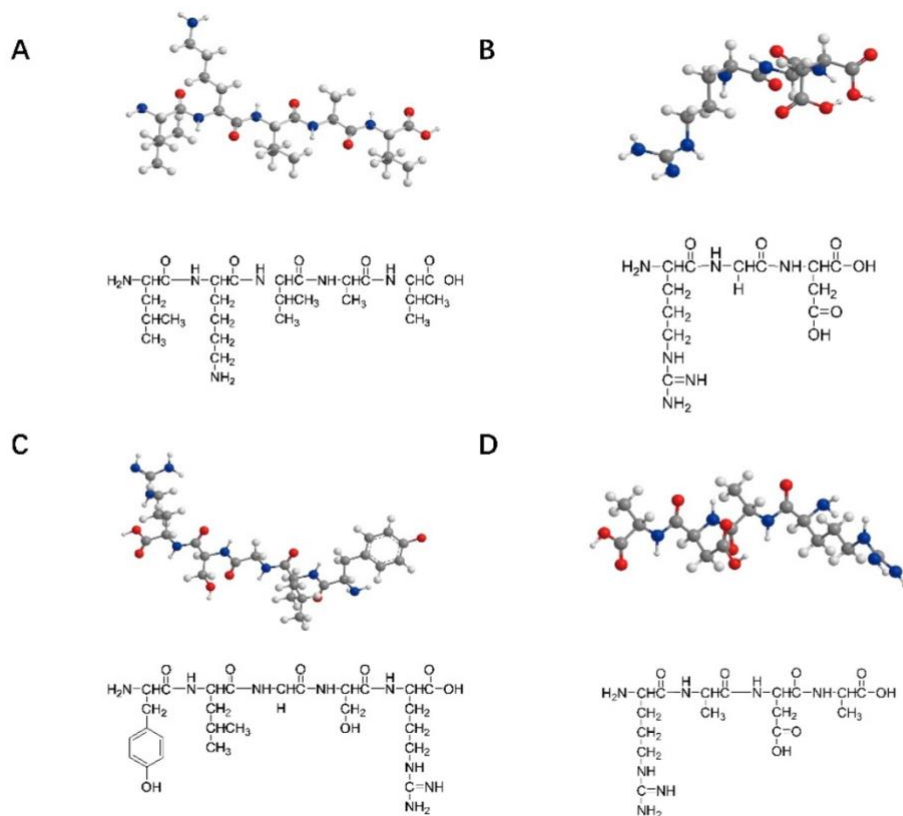


Figura 4.3: Strutture SAP comunemente usate nella rigenerazione a seguito di lesione ai nervi periferici. A) IKVAV, B) RGD, C) YIGSR, D) RADA16.

IKAV simula il microambiente appropriato necessario per la crescita delle cellule nervose durante il processo di riparazione del nervo periferico: infatti promuove l'adesione, la differenziazione e la crescita degli assoni dei neuroni nell'area nervosa periferica lesa. Inoltre, IKAV può indebolire la funzione di adesione e differenziazione delle cellule gliali che formerebbero la cicatrice, e inibire i fattori avversi che ostacolano la rigenerazione dei nervi.

RGD e YIGSR possono promuovere l'adesione cellulare, in particolare il peptide RGD viene spesso associato ad altri materiali per migliorarne le proprietà adesive.

RADA16 è un peptide con proprietà idrofiliche e lipofiliche, può autoassemblarsi in idrogel nanofibrosi consegnando neuronutrienti alle cellule nervose e svolgendo un ruolo chiave nella rigenerazione a seguito di lesione al tessuto nervoso [35,37]. RADA16 ha un ruolo essenziale nell'adesione delle cellule nervose, nella rigenerazione neuronale e nell'allungamento assonale.

Capitolo 5: Sfide e sviluppi futuri degli idrogel

Gli ultimi decenni hanno evidenziato un cambiamento nei progetti, nelle tecniche di fabbricazione, nelle proprietà e nelle applicazioni degli idrogel nell'ingegneria biomedica.

Gli idrogel vengono utilizzati in medicina rigenerativa per numerosi scopi: rigenerazione e riparazione dei tessuti, guarigione di ferite e trattamento di infezioni batteriche. Il loro ampio utilizzo è giustificato dalle loro proprietà biologiche, chimiche e meccaniche. In particolare, le principali proprietà biologiche sono: biocompatibilità, non tossicità, biodegradabilità e biofunzionalità; le proprietà chimiche e meccaniche sono: possibilità di transizione da soluzione a gel, proprietà fisico-chimiche simili all'ECM, possibilità di controllare il grado di rigonfiamento e di porosità e ampia disponibilità di diversi metodi di sintesi per ottenere vari livelli di reticolazione.

Gli idrogel sono matrici in grado di incapsulare cellule, fattori di crescita, proteine e farmaci e successivamente rilasciarli in situ tramite una somministrazione controllata. Il rilascio dagli idrogel avviene principalmente attraverso il loro rigonfiamento, quindi varia in base al tasso di rigonfiamento, alla capacità di permeazione e alla resistenza meccanica della matrice stessa.

Gli idrogel possono essere prodotti in varie formulazioni come, ad esempio, patches, sfere di idrogel, fibre di idrogel, però la formulazione più usata è quella iniettabile perché evita di utilizzare procedure di somministrazione invasive e causa meno dolore al paziente.

Quando le proprietà degli idrogel vengono modificate in risposta a diversi stimoli provenienti dall'ambiente circostante, gli idrogel vengono definiti "idrogel smart" o "idrogel intelligenti".

La capacità di mostrare rapide trasformazioni alla loro struttura in risposta ai cambiamenti delle condizioni ambientali, ne favorisce l'utilizzo come sistemi di somministrazione di cellule, proteine e farmaci. Gli idrogel intelligenti possono essere sensibili al pH, alla temperatura, a particolari ioni o sostanze, alla luce, agli enzimi, al glucosio oppure possono essere sensibili a più di un fattore.

Diverse sfide sono ancora associate all'uso delle matrici in idrogel, ovvero:

1. scarsa penetrazione cellulare e rilascio irregolare di cellule per via della mancanza di un adeguato controllo spaziale e temporale;
2. difficoltà associate all'ingegneria di tessuti complessi nei quali sono presenti più tipi di cellule;
3. scarse proprietà meccaniche microscopiche e macroscopiche, soprattutto negli idrogel naturali, che tendono a limitare il loro utilizzo in tessuti importanti;
4. difficoltà nel favorire l'angiogenesi nei tessuti;

5. possibilità di sintesi di idrogel senza l'uso di solventi o cross-linker tossici;
6. mancanza di una totale compatibilità con cellule, proteine o fattori di crescita per evitare i fenomeni di degradazione e denaturazione.

Inoltre, una delle sfide più importanti per gli idrogel è la difficoltà di sterilizzazione che avviene soprattutto quando si lavora con idrogel a base di materiali sintetici. D'altra parte, qualsiasi biomateriale deve resistere ad una sterilizzazione efficace per ottenere l'approvazione delle organizzazioni di regolamentazione e per procedere agli studi clinici in modo sicuro, infatti la sterilità riduce il rischio di infezioni correlate ai dispositivi medici [38].

La ricerca biomedicale sugli idrogel è principalmente concentrata sulle seguenti applicazioni: somministrazione di farmaci, geni, DNA e proteine, terapie contro il cancro, immunoterapia, somministrazione di vaccini, ingegneria tissutale e nanotecnologie.

Gli idrogel in futuro avranno un ruolo vitale nel campo della biomedicina e della nanotecnologia. Negli ultimi anni, numerosi studi hanno sottolineato l'uso di idrogel biomimetici intelligenti nella costruzione di sensori biochimici [38]. La capacità degli idrogel di rispondere ad uno stimolo circostante subendo meccanismi di cambiamento di fase li rende ideali per questa applicazione [38].

La ricerca biomedicale attuale si concentra anche sull'alterazione della chimica dei biopolimeri, portando a un miglioramento significativo delle proprietà meccaniche e biologiche degli idrogel. Le nuove ricerche sono per lo più indirizzate verso la creazione di idrogel iniettabili super porosi con tempi di risposta rapidi, idrogel autoassemblanti a base di copolimeri contenenti domini proteici e copolimeri a tre blocchi geneticamente modificati [38].

Come detto, gli idrogel vengono usati anche per applicazioni terapeutiche, ovvero terapia contro il cancro e guarigione di ferite [39]. Nel caso della cura contro il cancro, la citotossicità sistemica è associata alla chemio/radioterapia convenzionale. I chemioterapici non invasivi localizzati negli idrogel iniettabili possono evitare la tossicità associata alle terapie tradizionali e garantire il rilascio prolungato di farmaci e proteine nei siti tumorali [39]. Alcuni degli idrogel sintetici disponibili in commercio, come ad esempio TraceIT[®] e SpaceOAR[®], sono utilizzati terapeuticamente per proteggere le cellule sane dai danni indotti dalla radioterapia. TraceIT[®] contiene marcatori tessutali e microparticelle di idrogel di PEG con legato in modo covalente lo iodio. Lo iodio aiuta nella visualizzazione e identificazione del tessuto canceroso per un massimo di tre mesi, utilizzando ultrasuoni, tomografia computerizzata e risonanza magnetica [39]. L'idrogel SpaceOAR[®] è stato fabbricato per proteggere i tessuti sani dalle radiazioni durante la radioterapia per il carcinoma, quindi migliorare la persistenza e la resistenza

meccanica degli idrogel iniettabili naturali, e può avere un'importanza significativa nel trattamento dei carcinomi e dei tumori [39].

Le lesioni ai tessuti sono comunemente associate a tumori, fratture e diabete e spesso sono associati a gravi infezioni. Medicazioni attraverso l'utilizzo degli idrogel sono possibili grazie alle proprietà antibatteriche degli idrogel, alla loro bioadesività, buona biocompatibilità e biodegradabilità.

Negli ultimi decenni i batteri sono stati usati come candidati terapeutici viventi emergenti per il trattamento delle malattie come, ad esempio, il cancro [40]. La batterioterapia presenta alcune sfide importanti: limitare la clearance in vivo, mantenere risposte locali sufficienti dopo la somministrazione e evitare una certa tossicità ed effetti collaterali. Il primo approccio per risolvere le problematiche sopra descritte era quello di modificare la superficie batterica mediante tecniche fisiche, tuttavia i problemi legati alla vitalità batterica e i rischi di infezione ne hanno limitato l'utilizzo. L'uso di idrogel è una soluzione emergente per il rilascio locale di ceppi batterici terapeutici. Rispetto agli altri scaffolds gli idrogel presentano proprietà uniche per soddisfare le esigenze della somministrazione di terapie batteriche. Infatti gli idrogel sono adatti per accogliere i batteri, anche se questi hanno un volume molto più grande rispetto a farmaci e molecole, poiché possiedono adeguate proprietà chimico-fisiche per mantenere la vitalità batterica. Inoltre, grazie alla possibilità di regolare porosità e proprietà meccaniche, possono proteggere i batteri e gli agenti terapeutici in modo controllabile e sicuro [40].

Per quanto riguarda la produzione degli idrogel, la ricerca si concentrerà nel fabbricare idrogel su scala nanometrica. Tra i vari metodi di fabbricazione di idrogel quello più innovativo attualmente usato è il 3D-bioprinting, che riesce a creare strutture che combinano un alto controllo sia sulla risoluzione del materiale ma anche sul posizionamento delle cellule all'interno di costrutti ingegnerizzati [41]. Nel 3D-bioprinting sono utilizzate due tecnologie: getto d'inchiostro e microestrusione. Il metodo a getto d'inchiostro utilizza impulsi di pressione, creati da un breve riscaldamento elettrico o da onde acustiche, per creare goccioline di inchiostro che contengono cellule; invece la tecnica a microestrusione consiste in un flusso continuo di inchiostro [41]. Entrambi i metodi vengono utilizzati per fabbricare una vasta gamma di tessuti: ad esempio, la tecnica a gettito d'inchiostro è stata utilizzata per ingegnerizzare la cartilagine alternando deposizioni di strati di fibre di policaprolattone e condrociti in una matrice di fibrina-collagene [41]. Invece, la tecnica a microestrusione è stata utilizzata per fabbricare sostituiti protesici delle valvole aortiche utilizzando cellule muscolari lisce e interstiziali incorporate in una miscela di alginato [41].

In altre situazioni è possibile progettare nuovi tessuti senza dover creare una matrice, ad esempio, usando la tecnica dei fogli cellulari, che si basa sulla produzione di un foglio contenente cellule inserite in substrato termo-sensibile [41]. I fogli successivamente possono essere stratificati per produrre costrutti più spessi. Questo approccio viene usato, ad esempio, per la rigenerazione corneale.

Lo sviluppo degli idrogel è sempre in corso: infatti, grazie alle loro peculiari proprietà, potranno trovare ampio utilizzo in numerosi settori della medicina rigenerativa, offrendo un'alternativa più economica, meno invasiva e meno dolorosa rispetto a tutte le soluzioni tradizionali di rigenerazione tissutale.

Conclusioni

L'obiettivo della tesi è quello di descrivere le caratteristiche e le proprietà degli idrogel e di illustrare le loro principali applicazioni come possibili sostituti di tessuti biologici.

Dopo una prima descrizione delle principali proprietà degli idrogel, sono state illustrate le loro classificazioni in base ai principali metodi di sintesi e ai materiali di cui sono composti. Successivamente vengono descritte le applicazioni degli idrogel per la rigenerazione di vari tessuti biologici.

Nel tessuto cardiaco è stato riportato l'uso degli idrogel per la cura dell'infarto miocardico. In questa malattia, gli idrogel possono essere usati in forma iniettabile o di patches e, grazie alla possibilità di poter ospitare cardiomiociti, gli idrogel agiscono favorendo la rigenerazione del tessuto miocardico. È stato anche riportato l'utilizzo di "idrogel intelligenti", i quali favoriscono la rigenerazione cardiaca mediante la loro risposta attiva nei confronti dell'ambiente biologico circostante.

Nella descrizione delle applicazioni degli idrogel nel tessuto osseo, sono stati riportati due casi di studio. Nel primo caso di studio è stato illustrato il successo ottenuto tramite l'utilizzo di un idrogel a base di gelatina contenente il fattore di crescita dei fibroblasti FGF-2 per favorire la rigenerazione ossea a seguito di osteonecrosi della testa femorale. Nel secondo caso di studio è stato descritto l'uso di un idrogel bifunzionale a base di alginato e chitosano come possibile soluzione in grado di agire contro il tumore osseo e favorire la rigenerazione del tessuto osseo sano. In entrambi i casi, gli idrogel hanno contribuito alla rigenerazione tessutale attraverso l'uso di una tecnologia più semplice, immediata e meno dolorosa rispetto ai trattamenti chirurgici tradizionali.

Successivamente è stato presentato l'uso degli idrogel nella rigenerazione cartilaginea e sono stati riportati i principali tipi di idrogel utilizzati; inoltre, sono stati descritti i principali metodi di fabbricazione di idrogel per la rigenerazione del tessuto osteocondrale per riuscire ad ottenere la giusta comunicazione tra cartilagine e osso subcondrale.

Nel capitolo dedicato al tessuto nervoso sono stati riportati gli utilizzi degli idrogel nella rigenerazione tessutale a seguito di lesioni al midollo spinale e ai nervi periferici. In particolare, è stato menzionato l'uso di idrogel conduttori che, possedendo proprietà conduttive, riescono a ristabilire la conduzione elettrica nervosa.

Infine sono state citate le nuove sfide e prospettive future in relazione agli idrogel. Gli idrogel sono biomateriali ideali per la creazione di scaffold per il trasporto di cellule, farmaci, proteine e fattori di crescita; tuttavia sono ancora presenti alcune limitazioni di ordine meccanico e

biologico e per questo motivo la ricerca sugli idrogel è sempre in corso. Gli idrogel trovano largo impiego anche nella batterioterapia, infatti rappresentano un'ottima matrice per il trasporto, la proliferazione e la sopravvivenza di batteri.

Gli sviluppi futuri degli idrogel riguarderanno anche i settori della biomedicina e nanotecnologie, infatti verranno condotte ricerche sugli idrogel come sensori biochimici.

Bibliografia

- [1] Buwalda SJ, Boere KWM, Dijkstra PJ, Feijen J, Vermonden T, Hennink WE. Hydrogels in a historical perspective: from simple networks to smart materials. *Journal of controlled release*, 2014, 190: 254-273.
- [2] Swati S, Shachi T. A review on biomacromolecular hydrogel classification and its applications. *International journal of biological macromolecules*, 2020, 162: 737-747.
- [3] Peppas N, Hoffman A. Hydrogels. *Biomaterials science*, 2020, 153-166.
- [4] Gatti L. Tesi di Laurea Magistrale "Idrogel fotoreticolabili a base di cellulosa e amido. Politecnico di Torino, 2019, capitolo 1.
- [5] Caló E, Khutoryanskiy V. Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. *European polymer journal*, 2015, 65: 252-267.
- [6] Catoira M, Fusaro L, Di Francesco D, Ramella M, Boccafoschi F. Overview of natural hydrogels for regenerative medicine applications. *Journal of materials science: materials in medicine*, 2019, 30: 115.
- [7] Ubaid T, Gupta M, Pathak S, Patil R, Dohare A, Misra SK. Role of Biomaterials in Cardiac Repair and Regeneration: Therapeutic Intervention for Myocardial Infarction. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2022, 8: 3271-3298.
- [8] Radhakrishnan J, Krishnan UM, Sethuraman S. Hydrogel based injectable scaffolds for cardiac tissue regeneration. *Biotechnology Advances*, 2014, 32(2): 449-461.
- [9] Saludas L, Pascual-Gil S, Prósper F, Garbayo E, Blanco-Prieto M. Hydrogel based approaches for cardiac tissue engineering. *International Journal of Pharmaceutics*, 2017, 523(2): 454-475.
- [10] El-Sherbiny IM, Yacoub MH. Hydrogel scaffolds for tissue engineering: Progress and challenges. *Global Cardiology Science and Practice*, 2013, 3: 316-342.

- [11] Sun X, Nunes SS. Overview of hydrogel-based strategies for application in cardiac tissue regeneration. *Biomedical Materials*, 2015, 4, 10(3).
- [12] Ping L, Hu J, Wang J, Zhang J, Wang L. The Role of Hydrogel in Cardiac Repair and Regeneration for Myocardial Infarction: Recent Advances and Future Perspectives. *Bioengineering*, 2023, 10(2): 165.
- [13] Peña B, Laughter M, Jett S, Rowland TJ, Taylor MRG, Mestroni L, Park D. Injectable Hydrogels for Cardiac Tissue Engineering. *Macromolecular Bioscience*, 2018, 18(6).
- [14] Yue S, He H, Li B, Hou T. Hydrogel as a Biomaterial for Bone Tissue Engineering: A Review. *Nanomaterials (Basel)*, 2020,10(8): 1511.
- [15] Bai X, Gao M, Syed S, Zhuang J, Xu X, Zhang XQ. Bioactive hydrogels for bone regeneration. *Bioactive Materials*, 2018, 3: 401-417.
- [16] Sugaya S, Miyama A, Yamada M, Seki M. Fabrication of functional hydrogel microbeads utilizing non-equilibrium microfluidics for biological applications. *International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science*, 2011, 75-78.
- [17] Lee S-H, Shin H. Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2007, 59: 339-359.
- [18] Kuroda, Y, Kawai, T, Goto K. Clinical application of injectable growth factor for bone regeneration: a systematic review. *Inflammation and Regeneration*, 2019, 39.
- [19] Kuroda Y, Asada R, So K, et al. A pilot study of regenerative therapy using controlled release of recombinant human fibroblast growth factor for patients with pre-collapse osteonecrosis of the femoral head. *International Orthopaedics (SICOT)*, 2016, 40: 1747–1754.
- [20] Luo S, Wu J, Jia Z, Tang P, Sheng J, Xie C, Liu C, Gan D, Hu D, Zheng W, Lu X. An Injectable, Bifunctional Hydrogel with Photothermal Effects for Tumor Therapy and Bone Regeneration. *Macromolecular Bioscience*, 2019, 19(9).

- [21] Di Bello C, Bagno A. Interazioni tra biomateriali e tessuti. Pàtron Editore, 2009, 14: 138:143.
- [22] Benmassaoud MM, Gultian KA, DiCerbo M, Vega SL. Hydrogel screening approaches for bone and cartilage tissue regeneration. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2020, 1460(1): 25-42.
- [23] Zhang H, Wu S, Chen W, Hu Y, Geng Z, Su J. Bone/cartilage targeted hydrogel: Strategies and applications. *Bioactive Materials*, 2022, 23: 156-169.
- [24] Shuang Li, Dongyang Niu, Tuhe Shi, Wentao Yun, Shifeng Yan, Guohua Xu, and Jingbo Yin. Injectable, In Situ Self-cross-linking, Self-healing Poly(l-glutamic acid)/Polyethylene Glycol Hydrogels for Cartilage Tissue Engineering. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2023, 9(5): 2625-2635.
- [25] Trucco D, Vannozzi L, Teblum E, Telkhozhayeva M, Nessim GD, Affatato S, Al-Haddad H, Lisignoli G, Ricotti L. Graphene Oxide-Doped Gellan Gum–PEGDA Bilayered Hydrogel Mimicking the Mechanical and Lubrication Properties of Articular Cartilage. *Advanced Healthcare Materials*, 2021, 10, 7.
- [26] Suri S, Walsh DA. Osteochondral alterations in osteoarthritis. *Bone*, 2012, 51(2): 204-211.
- [27] Yang J, Zhang YS, Yue K, Khademhosseini A. Cell-laden hydrogels for osteochondral and cartilage tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 2017, 57 :1-25.
- [28] Di Bello C, Bagno A. Biomateriali: dalla scienza dei materiali alle applicazioni cliniche. Pàtron Editore, 2016, 5:145-148.
- [29] Silverthorn DU. Fisiologia umana: un approccio integrato. Pearson, 2020, 8: 211-215.
- [30] Bordoni M, Scarian E, Rey F, Gagliardi S, Carelli S, Pansarasa O, Cereda C. Biomaterials in neurodegenerative disorders: a promising therapeutic approach. *International journal of molecular science*, 2020, 21: 3243.

- [31] Guo B, Ma PX. Conducting polymers for tissue engineering. *Biomacromolecules*, 2018, 19: 1764-1782.
- [32] Yongping L, Lipeng Q, Bowen Q, Baolin G. Conductive hydrogels for tissue repair. *Chemical Science*, 2023, 14, 3091-3116.
- [33] Lv Z, Dong C, Zhang T, Zhang S. Hydrogels in spinal cord injury repair: a review. *Frontiers in Bioengineering and biotechnology*, 2022, 10.
- [34] Macaya D, Spector M. Injectable hydrogel materials for spinal cord regeneration: a review. *Biomedical Materials*, 2012, 7.
- [35] Liu Y, Zhang X, Xiao C, Liu B. Engineered hydrogels for peripheral nerve repair. *Materials Today Bio*, 2023, 20.
- [36] Zhang F, Zhang M, Liu S, Li C, Ding Z, Wan T, Zhang P. Application of hybrid electrically conductive hydrogels promotes peripheral nerve regeneration. *Gels*, 2022, 8: 41.
- [37] Zhang P, Li L, An H, Zhang P, Liu P. Repair of peripheral nerve injury using hydrogels based on self-assembled peptides. *Gels*, 2021, 7: 152.
- [38] Mantha S, Pillai S, Khayambashi P, Upadhyay A, Zhang Y, Tao O, Pham HM., Tran SD. Smart hydrogels in tissue engineering and regenerative medicine. *Materials*, 2019,12: 3323.
- [39] Almawash S, Osman SK, Mustafa G, El Hamd MA. Current and future prospective of injectable hydrogels-design challenges and limitations. *Pharmaceuticals*, 2022, 15: 371.
- [40] Yu S, Sun H, Li Y, Wei S, Xu J, Liu J. Hydrogels as promising platforms for engineered living bacteria-mediated therapeutic systems. *Materials today bio*, 2022,16.

- [41] Mao AS, Mooney DJ. Regenerative medicine: current therapies and future directions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112.

Sitografia

- [1*] <https://www.ior.it/curarsi-al-rizzoli/osteonecrosi-della-testa-del-femore>

- [2*] <https://www.santannapisa.it/it/news/medicina-rigenerativa-creato-un-idrogel-doppio-strato-grado-di-ripristinare-le-proprietà>

- [3*] <https://www.materdomini.it/enciclopedia/anatomia/sistema-nervoso-periferico>

Ringraziamenti

Vorrei riservare quest'ultima parte della tesi per ringraziare tutte le persone che mi hanno sostenuta durante il mio percorso universitario.

In primis, desidero ringraziare il mio relatore Andrea Bagno, per la sua disponibilità e i suoi consigli fondamentali per la stesura della tesi.

Ringrazio infinitamente i miei genitori per avermi sostenuta nei momenti di difficoltà e avermi sempre spronata ad andare avanti, standomi vicino e appoggiando ogni mia scelta.

Un grazie speciale va alle mie amiche di casa, "le ragazze di dodici". Siamo amiche da sempre e nonostante i nostri percorsi di vita siano diversi, non ci siamo mai perse. Siete le mie prime amiche, con voi ho condiviso tutti gli anni della mia adolescenza e anche durante questo percorso universitario ci siete sempre state e mi avete sempre sostenuta.

Un doveroso ringraziamento è per i miei compagni di corso. Senza di voi l'università non sarebbe stata così bella, avete reso indimenticabili le mie giornate al DEI. Per me siete sempre stati dei punti di riferimento, degli amici con cui confrontarsi e, a volte, anche lamentarsi. Indimenticabili saranno i nostri aperitivi dopo lezione, i mercoledì universitari, i pranzi nel cortile del DEI, i caffè alle macchinette e le nostre facce addormentate alla mattina a lezione.

Infine, il ringraziamento più importante va ai miei amici di Camplus. Vivere e condividere la mia triennale con voi è stata l'esperienza più bella che potessi fare. Rappresentate i ricordi più importanti del mio percorso universitario, Padova per me siete voi, la mia seconda famiglia. Non dimenticherò mai le nostre cene, le feste in lavanderia, i risotti, le tisane alla sera e tutti i momenti di quotidianità che ho sempre vissuto con voi. Mi avete accolto a braccia aperte nonostante la mia timidezza e mi avete sempre sostenuta nelle mie difficoltà dandomi consigli e anche tanti abbracci.