



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**



DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

**“INGEGNERIA TESSUTALE
PER LA RIGENERAZIONE NEURONALE”**

Relatore: Prof. Andrea Bagno

Laureanda: Nazzi Elisa

ANNO ACCADEMICO 2021 – 2022

Data di laurea: 22 luglio 2022

Indice

Abstract	3
1. Introduzione	
1.1. Biologia cellulare del sistema nervoso	4
1.2. Fasci di assoni nel sistema nervoso: nervi periferici e tratti del sistema nervoso centrale	6
1.3. Cause dei danni al sistema nervoso	7
1.3.1. Lesioni al midollo spinale (SCI)	8
1.3.2. Trauma cranico (TBI)	9
1.3.3. Ictus	9
1.3.4. Malattie neurodegenerative	10
1.4. Rigenerazione nel sistema nervoso periferico e centrale	10
1.4.1. Limiti alla rigenerazione: fattori inibitori, cicatrice gliale	12
1.5. Tecniche terapeutiche tradizionali	13
1.6. Ingegneria tessutale per la rigenerazione neuronale	15
2. Biomateriali usati come scaffold	
2.1. Idrogel	17
2.2. Idrogel a base naturale	17
2.2.1. Agarosio	18
2.2.2. Alginato	19
2.2.3. Collagene	20
2.2.4. Fibrina	20
2.2.5. Chitosano	21
2.2.6. Acido Ialuronico	22
2.2.7. Cheratina	22
2.3. Idrogel sintetici	22
2.3.1. Idrogel a base di metacrilato	23
2.3.2. Poli(etilenglicole) (PEG)	24
2.4. Nanoparticelle	25
2.5. Nanofibre	26

2.6. Nanomateriali a base di carbonio	29
2.7. Peptidi auto-assemblanti	31
3. Criteri di progettazione degli scaffold	
3.1. Biocompatibilità e biodegradabilità	32
3.2. Permeabilità e porosità	33
3.3. Proprietà biomeccaniche	35
3.4. Struttura superficiale	35
4. Ruolo delle biomolecole nella rigenerazione neuronale	
4.1. Adesione cellulare attraverso proteine del ECM	37
4.2. Rilascio di fattori di crescita	38
4.2.1. Fattore di crescita nervoso NGF	38
4.2.2. Fattore neurotrofico derivato dal cervello BDNF	39
4.2.3. Neurotrofina-3 NT-3	39
4.2.4. Fattore neurotrofico derivato dalla linea cellulare gliale GDNF	40
4.3. Rilascio di fattori che bloccano gli inibitori della rigenerazione neurale	40
5. Combinazione di biomateriali e trapianto di cellule per la rigenerazione neuronale	
5.1. Terapie cellulari	42
5.2. Cellule staminali embrionali	42
5.3. Cellule staminali pluripotenti indotte	43
5.4. Cellule staminali neurali	44
5.5. Cellule staminali mesenchimali	45
5.5.1. Cellule staminali derivate dal midollo osseo (BMSC)	46
5.5.2. Cellule staminali derivate dal tessuto adiposo (ADSC)	47
5.5.3. Cellule staminali del cordone ombelicale umano (HUCMSC)	47
5.6. Cellule gliali	48
5.6.1. Cellule di rivestimento olfattivo	48
5.6.2. Cellule di Schwann	49
5.7. Strategie combinate di scaffold e trapianto cellulare	50
5.8. Accostamento con la terapia genica	53
5.8.1. Sistemi di rilascio genico	54
6. Conclusioni	56
7. Abbreviazioni	57
Bibliografia	58

Abstract

Il sistema nervoso è una componente fondamentale del corpo umano e i danni a suo carico, sia per lesioni che per malattia, possono provocare conseguenze gravi o potenzialmente letali.

Ripristinare il sistema nervoso danneggiato è una grande sfida a causa della sua complessità anatomica e funzionale e della limitata capacità rigenerativa. L'ingegneria tissutale offre una possibile soluzione per la rigenerazione neuronale. Si stanno compiendo studi per produrre una matrice ideale basata su biomateriali sintetici e naturali che corrispondano alle esatte proprietà biologiche e meccaniche del tessuto. Inoltre, attraverso la combinazione con molecole bioattive ed altre tecniche, come la terapia cellulare (sfruttando cioè l'uso di cellule staminali o cellule gliali mature), la ricrescita assonale è facilitata per ottenere un recupero funzionale delle malattie nervose.

In questa tesi verranno illustrati i ruoli dei biomateriali e delle terapie basate su cellule come singoli approcci terapeutici per la riparazione neurale. Inoltre, verrà evidenziata l'importanza degli approcci combinatori delle due tecniche per garantire un recupero ottimale, nonché i recenti progressi e risultati di questi promettenti strumenti per la rigenerazione del tessuto neurale.

Capitolo 1

Introduzione

1.1 Biologia cellulare del sistema nervoso

Il sistema nervoso è un complesso insieme di cellule incaricate di dirigere, supervisionare e controllare tutte le funzioni e le attività dei nostri organi interni e del nostro corpo. Si può suddividere nel sistema nervoso centrale (SNC), costituito dal cervello e dal midollo spinale, e nel sistema nervoso periferico (SNP), formato da neuroni sensoriali (afferenti) e da neuroni efferenti. A partire dai recettori sensoriali, distribuiti in tutto il corpo, si sviluppa il flusso di informazioni che coinvolge il sistema nervoso. Questi recettori percepiscono le più piccole variazioni nelle condizioni dell'ambiente interno ed esterno; tramite i neuroni sensoriali, inviano informazioni al SNC, che è il centro di integrazione dei riflessi nervosi. I neuroni del SNC integrano le informazioni in arrivo e determinano o meno una risposta che viene inviata tramite i neuroni efferenti fino al raggiungimento del bersaglio (per la maggior parte muscoli o ghiandole). I neuroni efferenti si suddividono in sezione motoria somatica, che controlla i muscoli scheletrici, e sezione autonoma, che controlla muscolatura liscia, miocardio, ghiandole esocrine e parte di quelle endocrine, e alcuni tipi di tessuto adiposo.

Il tipo primario di cellula nel sistema nervoso è il neurone, che è il tipo di cellula eccitabile incaricato di inviare e ricevere segnali attraverso i potenziali d'azione. Il neurone comprende lunghi processi che si originano dal corpo cellulare (soma). I processi si possono distinguere in dendriti, se ricevono segnali in arrivo, o assoni, se trasportano informazioni in uscita, che terminano nei terminali presinaptici contenenti i bottoni sinaptici (Figura 1.1A). I neuroni possono essere strutturalmente classificati in neuroni multipolari (un assone e più dendriti altamente ramificati), bipolari (un assone e un dendrite) e neuroni pseudounipolari (due assoni: periferico e centrale) (Figura 1.1B) e funzionalmente classificati in neuroni sensoriali o afferenti (trasportano informazioni verso il SNC), interneuroni (trasmettono messaggi all'interno del SNC) e neuroni motori o efferenti (trasportano informazioni dal SNC ai muscoli e alle ghiandole). I lunghi assoni dei neuroni periferici, uniti al tessuto connettivo, formano dei cordoni denominati nervi: nervi sensitivi (trasportano segnali afferenti), nervi motori (trasportano segnali efferenti) e nervi misti (trasportano segnali in entrambe le direzioni).

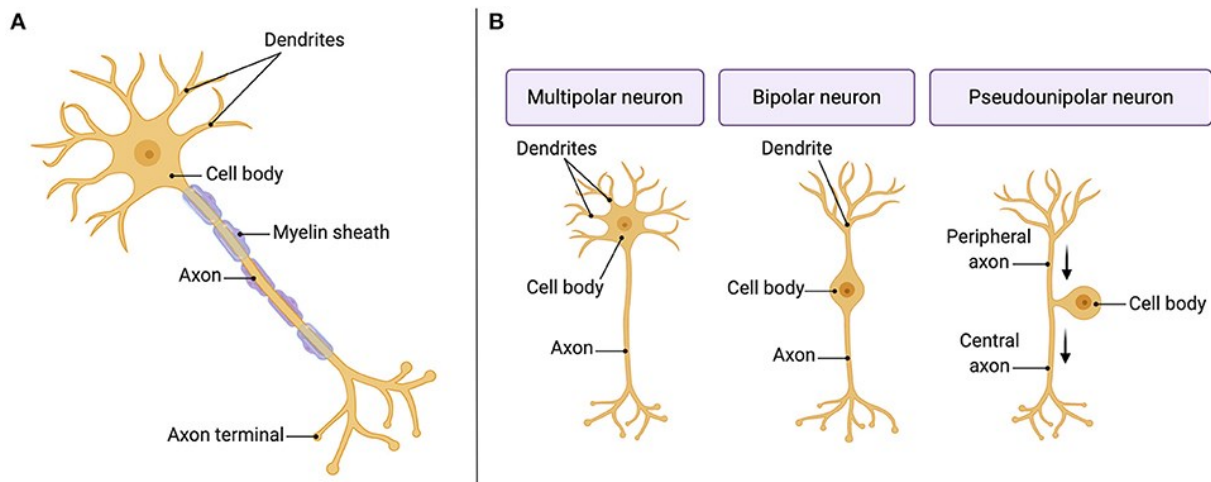


Figura 1.1. (A) Parti strutturali di un neurone. (B) Diverse classi strutturali di neuroni [1].

L'altro tipo di cellula nel tessuto nervoso è la neuroglia (più comunemente detta glia) più piccola e prevalente; è una famiglia di cellule di supporto biochimico che circonda i somi, gli assoni e i dendriti dei neuroni sia nel SNC che nel SNP. La glia del SNP è costituita da cellule di Schwann (SC) e le cellule satellite perineuronali (Figura 1.2A). Le SC avvolgono molte volte un segmento di 1-1.5 mm di un assone, creando uno strato protettivo bianco lucido chiamato guaina mielinica, che funge da isolante e accelera la trasmissione del segnale, e lasciando minuscoli interstizi, chiamati nodi di Ranvier. Le cellule satellite sono cellule piatte che racchiudono e supportano i corpi cellulari dei neuroni nel SNP.

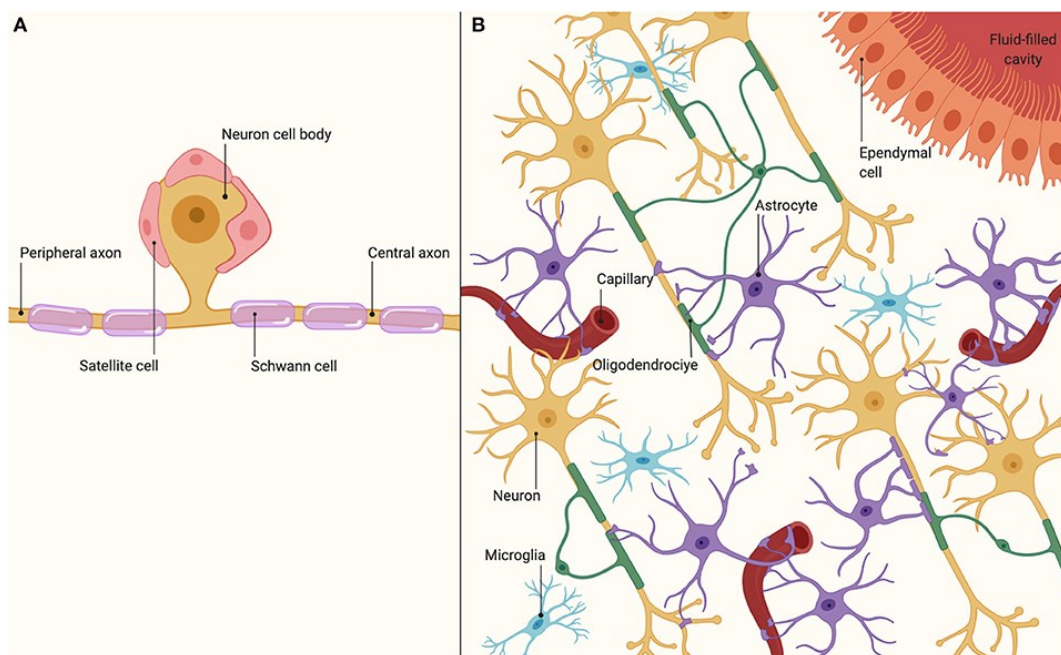


Figura 1.2 (A) Cellule e organizzazione del sistema nervoso periferico. (B) Cellule e organizzazione nel sistema nervoso centrale [1].

La glia del SNC comprende astrociti (astroglia), oligodendrociti (oligodendroglia), microglia e cellule ependimali (Figura 1.2B). Gli astrociti svolgono diverse funzioni: ancorano capillari e neuroni, corpi cellulari e dendriti per il trasporto dei nutrienti, entrano in contatto con le cellule ependimali del sistema ventricolare, mantengono l'omeostasi nel liquido extracellulare del SNC, aiutano nella formazione della barriera emato-encefalica, e riparano il tessuto cerebrale danneggiato. Gli oligodendrociti sono gli equivalenti delle SC del SNP che fabbricano e mantengono la mielina del SNC, con la differenza che un singolo oligodendrocita può estendere i suoi processi avvolgendosi attorno a più assoni. Le microglia sono cellule con funzioni legate sia alla risposta immunitaria, rimuovendo i detriti prodotti in seguito a lesioni o morte neuronale, che al mantenimento dell'omeostasi. Le cellule ependimali sono cellule specializzate che formano uno strato epiteliale a permeabilità selettiva, l'ependima (fonte di cellule staminali nervose), che separa i compartimenti liquidi del SNC. Le cellule gliali svolgono, quindi, molte funzioni nel sistema nervoso e, inoltre, producono fattori trofici e di crescita per la rigenerazione e plasticità di esso [1, 2].

1.2. Fasci di assoni nel sistema nervoso: nervi periferici e tratti del sistema nervoso centrale

I fasci di assoni ricevono nomi specifici come nervo nel SNP e tratto o fascio nel SNC. I nervi contengono solo la parte assonale del neurone. I corpi cellulari dei neuroni sensoriali si trovano in strutture adiacenti al midollo spinale (ganglio della radice dorsale) o nei gangli cranici, mentre i corpi cellulari dei motoneuroni si trovano all'interno del SNC (midollo spinale o tronco cerebrale).

Ogni nervo del SNP è costituito da tre elementi tissutali essenziali: assoni, SC (e guaine mieliniche) e tessuto connettivo (endonevrio, perinevrio ed epinevrio) (Figura 1.3A). Nel SNP sono presenti anche gangli, formati da corpi cellulari e cellule satelliti associate ai nervi periferici. Un nervo periferico è costituito da numerose fibre nervose formate da assoni e SC associati. Ogni singola unità è circondata da uno strato di tessuto connettivo (contenente collagene, laminina e fibronectina), l'endonevrio, e i fascicoli, complessi di assoni, separati dal perinevrio. A loro volta, gruppi di fascicoli e vasi sanguigni, che forniscono i nutrienti alle cellule, sono legati insieme dall'epinevrio. La guaina mielinica, che circonda un assone all'interno di una fibra nervosa, è una struttura composta da strati multipli concentrici di membrana fosfolipidica. Oltre a essere di supporto agli assoni, essa funge da isolante e accelera la trasmissione dei segnali. Quasi tutte le fibre nervose di diametro superiore a 3 μm sono

mielinizzate, e quelli al di sotto non lo sono. Solo una SC incapsula una fibra nervosa mielinizzata, ma un gruppo di fibre non mielinizzate potrebbe condividere la stessa SC.

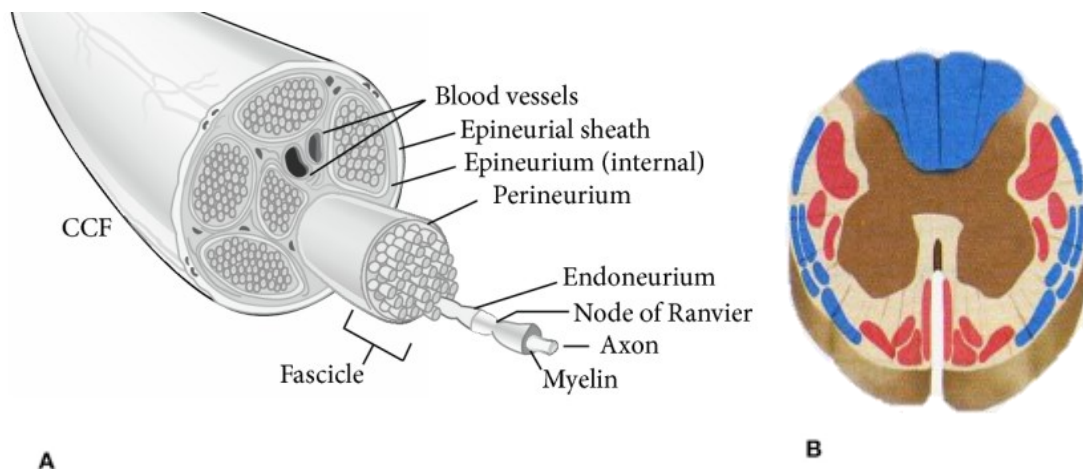


Figura 1.3 (A) Anatomia del nervo periferico. (B) Tratti del midollo spinale divisi in tratti ascendenti (blu) e tratti discendenti (rosso) [3].

Gli assoni del SNC si trovano nella sostanza bianca, il cui colore chiaro deriva dalla presenza della guaina mielinica. La sostanza bianca del midollo spinale può essere suddivisa in colonne costituite da fasci di assoni che trasferiscono le informazioni verso l'alto o il basso del midollo. I tratti o fasci ascendenti trasportano informazioni sensoriali fino al cervello. I tratti o fasci discendenti portano principalmente segnali efferenti (motori) dal cervello verso la periferia (muscoli e ghiandole). I tratti propriospinali sono quelli che originano e terminano all'interno del midollo spinale. Quindi, il midollo spinale è costituito da un gran numero di tratti ascendenti e discendenti (Figura 1.3B), ciascuno localizzato in parti particolari della colonna dorsale, laterale o ventrale della sostanza bianca.

In sintesi, i fasci assonali rappresentano un'architettura allineata e unidirezionale che rende possibile lo sviluppo del tessuto nervoso assonale. Quando si verificano lesioni dei nervi periferici, lesioni del midollo, trauma cranico o malattie neurodegenerative, l'intricata architettura subisce alterazioni che portano alla rottura dei circuiti neuronali e all'inibizione della ricrescita nervosa [1, 2, 3].

1.3. Cause dei danni al sistema nervoso

L'origine dei danni al SNC è di diverso tipo, come traumi dovuti a cadute, incidenti stradali e aggressioni, che sono le principali cause di disabilità a lungo termine nella popolazione sia urbana che rurale in tutto il mondo. Inoltre, le lesioni cerebrali traumatiche legate allo sport contribuiscono in modo significativo nei paesi sviluppati. L'ictus e le malattie

neurodegenerative, come il morbo di Alzheimer, il morbo di Parkinson, la malattia di Huntington, la malattia da prioni, la sclerosi laterale amiotrofica e la demenza frontotemporale, sono causa di una discreta perdita di cellule in specifiche regioni del cervello, provocando danni permanenti.

Anche il SNP è vulnerabile a diversi tipi di lesioni traumatiche a causa dell'ampia presenza di nervi in tutto il corpo. Le principali cause dei danni al sistema nervoso riguardano le lesioni dei nervi periferici (PNI), che sono principalmente correlate a traumi, dovuti ad incidenti automobilistici, sul lavoro o violenze, tumori e lesioni iatrogene [4]. Queste lesioni spesso portano alla rottura dei circuiti neuronali e alla denervazione di organi importanti, con conseguenti deficit funzionali. I pazienti possono soffrire di disabilità permanenti con una possibilità di recupero minima. Tra i vari tipi di PNI, le transezioni nervose complete (lesioni che provocano una totale perdita di sensibilità e movimento al di sotto del nervo leso), specialmente quelle che si verificano più prossimalmente nel nervo o provocano un ampio divario, hanno una possibilità limitata di recupero che porta a una diminuzione della funzione motoria e sensoriale.

1.3.1. Lesioni al midollo spinale (SCI)

La lesione del midollo spinale (*Spinal Cord Injury, SCI*) colpisce milioni di persone in tutto il mondo e in genere ha conseguenze per tutta la vita. Si verifica in circa 17.000 persone ogni anno negli Stati Uniti (2020 Data Sheet from NSCISC, [4]) e in oltre 300.000 persone ogni anno nel mondo, tipicamente causata da incidenti automobilistici (38%), cadute (32%), violenza (14%) e incidenti sportivi e ricreativi (8%). Le malattie possono anche causare o aumentare il rischio di lesioni del midollo spinale. La perdita di funzionalità che i pazienti sperimentano è dettata dal livello spinale della lesione e dall'estensione e dalla precisa localizzazione anatomica del danno a questo livello. Oltre alle conseguenze immediate causate dalla perdita delle funzioni motorie, sensoriali e del sistema nervoso autonomo, i processi secondari (cicatrici gliali, demielinizzazione e formazione di cisti) nell'area ferita possono aggravare la lesione. I problemi successivi includono atrofia muscolare, dolore cronico, infezioni urinarie e piaghe da decubito. Gli sforzi per trovare agenti neuroprotettivi in grado di prevenire ulteriore morte cellulare e danni dopo la lesione primaria sono stati promettenti, ma finora nessun farmaco si è dimostrato clinicamente efficace per questo approccio negli esseri umani. Sono inoltre in corso ricerche per trovare interventi terapeutici innovativi e utili che migliorino o curino le lesioni del midollo spinale e, in particolare, l'ingegneria dei tessuti neurali ha grandi potenzialità per ripristinare la funzione di questi pazienti.

1.3.2. Trauma cranico (TBI)

Il trauma cranico è la principale causa di morte negli individui di età compresa tra 1 e 45 anni, con lesioni cerebrali traumatiche responsabili della maggior parte di questi casi e con oltre 60.000 decessi all'anno negli Stati Uniti (2019 Data sheet from CDC [5]). Le lesioni traumatiche possono includere traumi contudenti o penetranti e possono essere clinicamente classificate in lievi, moderate e severe in base al punteggio Glasgow Coma Scale [6]. Le forze meccaniche del trauma possono causare uno shock temporaneo alle reti neurali, nonché danni più duraturi ai tessuti e alle connessioni assonali tra i neuroni. Inoltre, sanguinamento, gonfiore e stiramento dei tessuti possono peggiorare la morte cellulare e causare varie forme di danno eccitotossico e cascate di messaggeri secondari che possono causare morte cellulare ritardata. Lesioni ripetute possono provocare la pericolosa "sindrome del secondo impatto" o, per periodi di tempo più lunghi, possono provocare encefalopatia traumatica cronica, che è caratterizzata da atrofia e neurodegenerazione nel cervello e segni clinici di demenza, depressione, perdita di memoria e altri cambiamenti comportamentali. L'ingegneria tessutale neuronale combinata con la terapia con cellule staminali detiene il maggior potenziale, nelle aree che hanno subito maggior danno a seguito del trauma, per il recupero delle reti neurali.

1.3.3. Ictus

L'ictus è un'interruzione dell'afflusso di sangue al cervello o al midollo spinale, con conseguente morte neuronale estesa in un arco di tempo compreso tra 20 minuti e 10 giorni dopo l'evento. Gli ictus sono divisi in emorragici (causati dall'esplosione di un vaso sanguigno o da un aneurisma) e ischemici (flusso sanguigno insufficiente), a loro volta suddivisi in trombotico (vaso bloccato da un coagulo formato localmente), embolico (vaso bloccato da un coagulo che viaggia nel sangue) e ischemico globale (dovuto a bassa pressione sanguigna sistemica, infarto miocardico). Circa l'87% degli ictus sono di tipo ischemico (2018 Data sheet from CDC [7]). I pazienti con ictus tipicamente mostrano una qualche forma di funzione neurale anormale, come incapacità di muovere un arto, incapacità di parlare correttamente, confusione e stato mentale alterato. I deficit neurologici primari in coloro che sopravvivono a un ictus sono l'emiparesi, l'incapacità di camminare autonomamente e l'incapacità di parlare. Questi sono tutti deficit neurologici che possono essere migliorati tramite l'ingegneria tessutale per la rigenerazione neuronale.

1.3.4. Malattie neurodegenerative

Le malattie neurodegenerative sono caratterizzate da disfunzione progressiva e morte delle cellule neurali e dei tessuti, che si traduce in varie forme di disturbi del movimento e declino cognitivo nel tempo.

Il morbo di Alzheimer è una malattia neurodegenerativa che coinvolge i lobi frontali del cervello dove hanno sede molti processi cognitivi. Pertanto, le manifestazioni della malattia possono includere una varietà di sintomi, tra cui perdita di memoria, capacità di giudizio alterata, confusione, sbalzi d'umore e progressivo deterioramento di molte funzioni corporee e della capacità di prendersi cura di se stessi. Come tutte le malattie neurodegenerative, questa è attualmente una malattia progressiva e irreversibile. Diverse aree del cervello possono essere colpite da questa malattia, compresa la corteccia frontoparietale, l'ippocampo e altri nuclei del cervello, e generalmente c'è una diminuzione dell'attività colinergica nel proencefalo.

Il morbo di Parkinson è un disturbo motorio degenerativo e progressivo classificato come malattia cerebrale, causato dalla morte dei neuroni dopaminergici nella sostanza grigia con conseguente deprivazione della dopamina, il neurotrasmettitore che consente il controllo dei movimenti. È caratterizzato da tremore a riposo, bradicinesia e rigidità, e i sintomi alla fine progrediscono verso la demenza. Con la perdita dei segnali dopaminergici, la complessità e il significato delle informazioni codificate in determinate attività neurali vengono perse e l'attività neurale viene maggiormente influenzata dall'attività delle vie colinergiche nei gangli della base. La Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA) colpisce principalmente i motoneuroni superiori e inferiori responsabili del controllo dei muscoli volontari. La morte dei motoneuroni inferiori nel midollo spinale provoca debolezza e atrofia dei muscoli, mentre la morte dei motoneuroni superiori provoca spasticità e perdita di coordinazione. Questo alla fine porta a difficoltà a muoversi, parlare, deglutire e respirare, provocando anche ulcere cutanee e infezioni polmonari, come avviene nei pazienti con lesioni al midollo spinale.

La malattia di Huntington è il risultato della perdita di tessuto neuronale nella corteccia del lobo frontale e nei gangli della base, in particolare nel nucleo caudato, caratterizzata da movimenti coreici involontari, disturbi psichiatrici e del comportamento e demenza [8].

1.4. Rigenerazione nel sistema nervoso periferico e centrale

Dopo una lesione del tessuto assonale, il SNC e il SNP si differenziano notevolmente nel meccanismo e nel loro potenziale di rigenerazione neuronale. Inoltre, l'evoluzione e l'esito della situazione rigenerativa possono dipendere da fattori molto diversi.

Nelle lesioni del SNP, il ripristino funzionale a seguito di lesioni nervose significative di lunghezza superiore ai 10 mm è generalmente scarso a causa dell'insufficiente reinnervazione assonale dei bersagli distali. La situazione è più favorevole quando è necessaria solo la riconnessione delle estremità distale e prossimale del fascio assonale ferito a distanze relativamente brevi. In questa situazione, la parte distale dell'assone, che è disconnessa dal corpo cellulare, va incontro a degenerazione walleriana, con conseguente frammentazione e disintegrazione dell'assone nelle prime 24-48 ore [3]. Le SC che circondano l'assone sopravvivono e producono citochine proinfiammatorie come il fattore di necrosi tumorale alfa (TNF- α) e l'interleuchina-1-alfa (IL-1 α), scartando la mielina che avvolge gli assoni e reclutando i macrofagi nel sito della lesione [1]. Questi ultimi, assieme alle SC, sono impiegati per rimuovere assoni degenerati e detriti mielinici. Inoltre, i macrofagi secernono citochine come l'interleuchina-1 (IL-1) e il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF) che stimolano la SC a dividersi, de-differenziare e proliferare distalmente alla lesione. Queste SC stimolate sono indotte a secernere fattori di crescita al fine di migliorare la sopravvivenza dei neuroni dopo la recisione (assotomia) e stimolare la rigenerazione degli assoni. Esse generano un cilindro composto da fibre altamente allineate formate dalla lamina basale, denominato Band Bünger, che funge da percorso per guidare l'assone e i coni di crescita delle SC dall'estremità prossimale all'estremità distale. In condizioni ottimali, i coni di crescita possono estendersi a una velocità di 1-3 mm/giorno [9]. In seguito, si sviluppa una struttura simile a un cono di crescita mobile. All'interno del corpo cellulare si verificano cambiamenti nell'espressione genica e nella produzione di proteine. Inoltre, nuove proteine vengono trasportate alla punta dell'assone in crescita, come la tubulina alfa 1 e la proteina associata alla crescita GAP43, che sovraregola sia i neuroni sensoriali che quelli motori, fino a quando gli assoni non si riconnettono con i loro bersagli (Figura 1.4A) [1].

I meccanismi di rigenerazione a seguito di danni neurali riportati nei tratti assonali del SNC sono più complessi di quelli del SNP. I fattori inibitori della ricrescita nel SNC includono la limitata capacità intrinseca degli assoni di rigenerarsi, la ampia lacuna nervosa formata, un ambiente inibitorio locale, le cellule in migrazione verso l'area lesa che formano una cicatrice gliale e la composizione chimica della matrice extracellulare (ECM) in corrispondenza della cicatrice formata. Dopo che un assone del SNC è ferito, si verifica la degenerazione walleriana nel tratto danneggiato. Tuttavia, la mielina degenerata e i detriti assonali dopo l'apoptosi degli oligodendrociti persistono molto più a lungo a causa dell'insufficiente reclutamento dei macrofagi. Inoltre, poche ore dopo l'infortunio, le microglia sono le prime cellule gliali a reagire. Gli astrociti diventano reattivi e collaborano alla formazione della cicatrice gliale, con

molecole inibitorie, come i proteoglicani, che rimangono per diverse settimane o mesi e complicano la rigenerazione assonale (Figura 1.4B) [1].

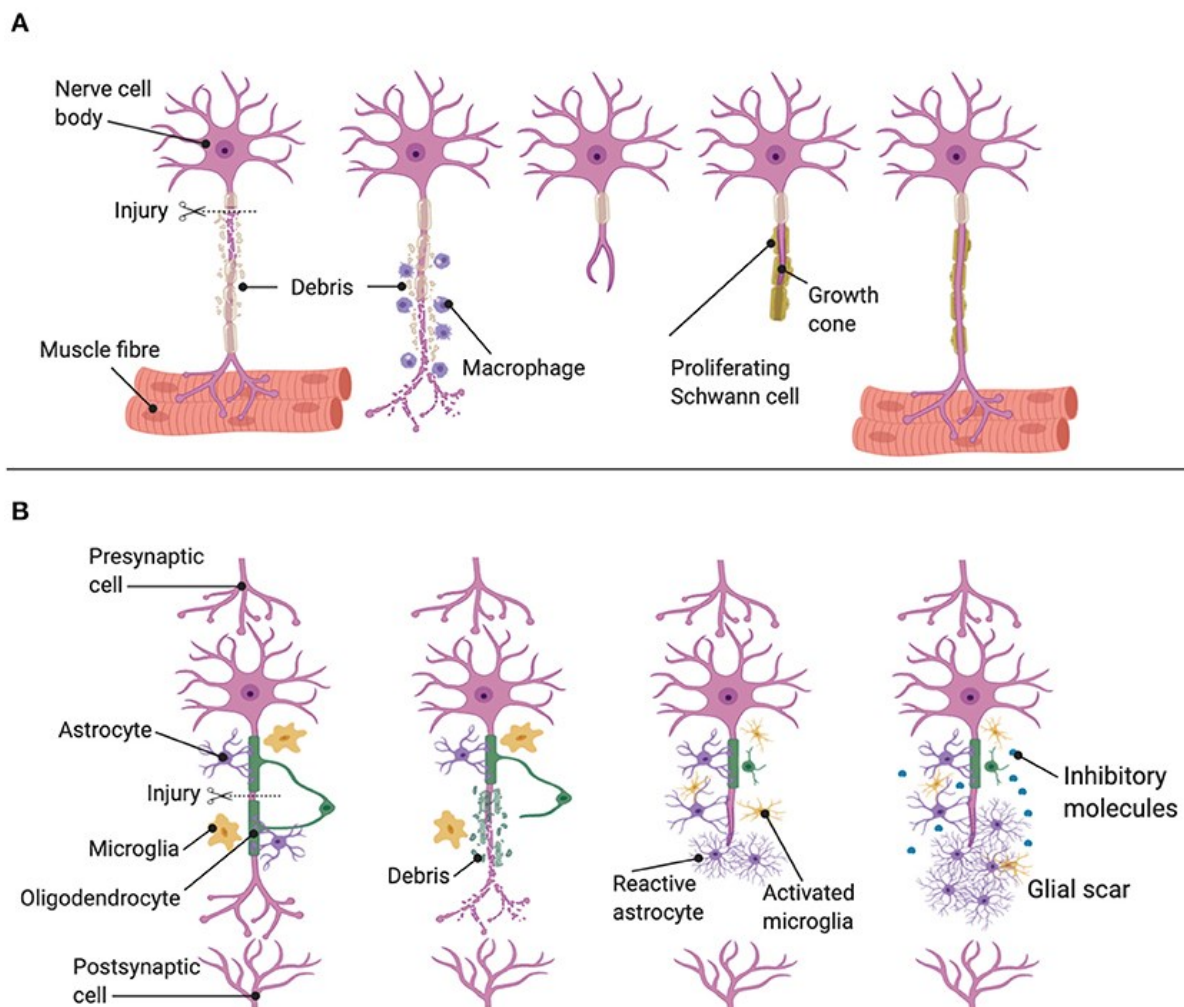


Figura 1.4 (A) Situazione rigenerativa nel SNP. SC e macrofagi proliferanti lavorano insieme per rimuovere i detriti di mielina, rilasciare neurotrofine e condurre gli assoni verso i loro bersagli sinaptici, con conseguente ripristino della funzione neuronale. (B) Situazione rigenerativa nel SNC. I pochi neuroni che sopravvivono all'assotomia tentano la rigenerazione e successivamente incontrano un'impenetrabile cicatrice gliale composta da mielina e detriti cellulari, oltre ad astrociti, oligodendrociti e microglia [1].

1.4.1. Limiti alla rigenerazione: fattori inibitori, cicatrice gliale

La non permissività del SNC adulto danneggiato alla crescita assonale è stata attribuita a tre classi di molecole: 1) inibitori della crescita associati alla mielina, 2) molecole di guida chemiopulsive e 3) proteoglicani altamente solfati, in particolare i proteoglicani condroitin solfato, che sono componenti della matrice extracellulare (ECM) che comprende le reti perineuronali [10].

Gli oligodendrociti che formano la mielina del SNC inibiscono la rigenerazione assonale attraverso un recettore della proteina di membrana neuronale Nogo-66 (NgR1). È stato

dimostrato che almeno tre distinte proteine espresse dagli oligodendrociti inibiscono l'estensione assonale, inclusa la glicoproteina associata alla mielina (MAG), la glicoproteina oligodendrocita-mielina (OMgp) e Nogo, le quali, nonostante non condividano alcuna somiglianza strutturale, si legano a recettori comuni tra cui NgR1 e PirB. Inoltre, diverse molecole che fungono da segnali repulsivi di guida assonale durante lo sviluppo, ad esempio semaforina 3A e 5A, Ephrin-B3 ed Ephrin-A4, possono limitare l'allungamento assonale nel SNC danneggiato. Un'altra importante classe di fattori inibitori della crescita estrinseci sono i proteoglicani condroitin solfato (CSPG), secreti dall'astroglia reattiva, che sono molecole grandi e ricche di cariche negative [10]. I CSPG legano e bloccano le normali proprietà di promozione della crescita della laminina e, inoltre, possono legarsi ai membri di almeno due classi distinte di recettori inibitori della crescita espressi sulle superfici degli assoni e quindi attivare specifici percorsi inibitori. Dopo la lesione del SNC, i CSPG vengono rapidamente sovraregolati nel sito della lesione dagli astrociti reattivi nei tessuti della cicatrice gliale. Il trauma del midollo spinale di solito induce una sovraespressione di CSPG nelle vicinanze della lesione con livelli più elevati nell'epicentro dei tessuti cicatriziali. Oltre alla barriera fisica dei tessuti cicatriziali inclusi astrociti reattivi, cellule meningei, fibroblasti e microglia, i livelli notevolmente aumentati di CSPG formano una potente barriera chimica per la rigenerazione degli assoni prevenendone l'allungamento [10].

La cicatrice gliale, che contribuisce insieme ad altri tipi di cellule all'arricchimento di CSPG, si forma dopo 1-2 giorni dalla lesione [11]. Alcuni astrociti reattivi proliferano rapidamente e popolano densamente l'area intorno al nucleo della lesione. Durante questo processo, questi astrociti iniziano ad estendere i processi allungati perpendicolarmente verso il nucleo della lesione. Perdono gradualmente i loro domini e diventano densi per formare un confine stretto. La rapida proliferazione degli astrociti reattivi si interrompe gradualmente circa due settimane dopo la lesione. Da 1 a 2 settimane a diverse settimane dopo l'infortunio, gli astrociti cicatriziali completano il loro cambiamento fenotipico e non orientano più i loro processi perpendicolarmente verso il nucleo della lesione ma diventano invece più paralleli e si sovrappongono tra loro, generando definitivamente una cicatrice gliale matura e compatta.

1.5. Tecniche terapeutiche tradizionali

Ad oggi, sono state adottate diverse tecniche terapeutiche per permettere la rigenerazione neuronale, ma ognuna di queste presenta diversi svantaggi per il paziente o il donatore. Per questo si ricercano nuove strategie terapeutiche che massimizzino la rigenerazione nervosa funzionale e migliorino gli esiti per i pazienti.

La riparazione diretta dei nervi con microsuture epineurali è uno dei trattamenti chirurgici gold standard per gravi lesioni quando è possibile ottenere una coaptazione senza tensione in un letto ben vascolarizzato [3]. Se ciò non è possibile, la tecnica di elezione è l'autoinnesto, il quale impiega un segmento nervoso prelevato da un sito meno importante dello stesso individuo. L'autoinnesto offre risultati incoraggianti e non è facile trovare un dispositivo che dia un risultato altrettanto soddisfacente, essendo attualmente utilizzato come riferimento standard o controllo positivo di altre soluzioni sperimentali. Tuttavia, gli autotrapianti hanno delle limitazioni come la bassa disponibilità del nervo donatore, sacrificano un nervo funzionante e possono provocare perdita sensoriale, cicatrici e formazione di neuromi nel sito donatore. Inoltre, nel sito di riparazione possono verificarsi mismatch dimensionali, fascicoli, cicatrici e fibrosi, portando a una scarsa rigenerazione [3].

Un'altra opzione tradizionale è quella di utilizzare allotrapianti o xenotrapianti di nervi cadaverici di donatori (da un animale), ma, nonostante garantiscano una fornitura illimitata prontamente accessibile ed evitino la morbidità del sito donatore, hanno delle limitazioni come la richiesta di immunosoppressione o decellularizzazione per prevenire il rigetto immunitario [3].

Un'ultima tecnica alternativa, nei casi in cui il moncone del nervo prossimale non sia disponibile o inaccessibile e invece il moncone distale danneggiato sia avvolto sul lato di un nervo donatore sano, è la riparazione end-to-side per il trattamento delle lacune nervose inferiori a 1 cm, ma, anche in questo caso, il sito donatore subirebbe danni irrecuperabili.

Inoltre, la rigenerazione nel SNC è minima e non esiste un trattamento clinico con un comprovato miglioramento della riparazione. Nella SCI, nel trauma cranico e nella malattia degenerativa, i danni iniziali si traducono in lesioni primarie che portano ad una rapida perdita delle funzionalità motorie, sensoriali e del sistema nervoso autonomo. I trattamenti attuali, invece di cercare di recuperare il tessuto danneggiato, cercano di prevenire la lesione secondaria con alte dosi di steroidi e mantenendo un adeguato apporto di ossigeno, flusso sanguigno e pressione nel trauma cranico. Per lesioni cerebrali più gravi, risulta essere necessario anche un intervento chirurgico per rimuovere gli ematomi e riparare le contusioni.

Quindi, a fronte di quanto sopra riportato, è necessario sviluppare una strategia biomimetica che possa fornire un ponte attraverso la lesione fornendo segnali morfologici, chimici e biologici ottimali per il recupero del tessuto nervoso.

1.6. Ingegneria tessutale per la rigenerazione neuronale

L'ingegneria tessutale consiste proprio nell'applicare i fondamenti della biologia e dell'ingegneria per sviluppare sostituti funzionali del tessuto danneggiato, con tre componenti generali: scaffold per il trapianto e il supporto cellulare, cellule in grado di creare una matrice funzionale e fattori bioattivi che supportano e regolano l'attività delle cellule (Figura 1.5) [6]. Un sostituto funzionale si riferisce a una soluzione ideale che ripristina completamente la funzione interessata, si integra al meglio con il tessuto circostante dell'ospite e dura per il resto della vita della persona interessata.

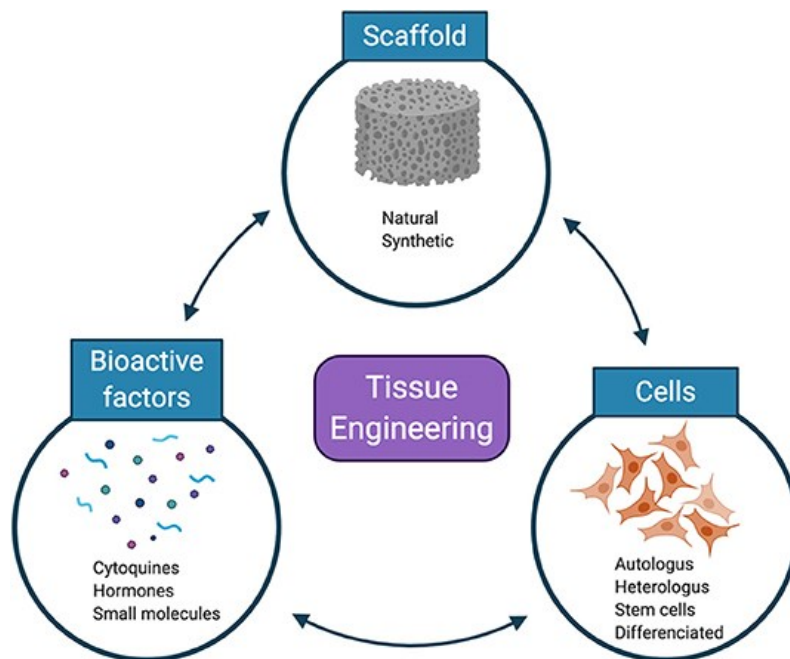


Figura 1.5. La triade dell'ingegneria dei tessuti. Scaffold, cellule e fattori bioattivi vengono utilizzati isolatamente o in combinazione per rigenerare il tessuto desiderato [1].

Le terapie di ingegneria tessutale hanno ottenuto importanti progressi nella ricostruzione di tessuti utili e sani praticamente in tutti i tessuti e gli organi del corpo umano negli ultimi 20 o 30 anni. Tuttavia, recuperare le connessioni perse nel sistema nervoso è stata tradizionalmente una sfida molto complessa rispetto alla quale i ricercatori hanno dovuto essere particolarmente cauti e rigorosi.

L'ingegneria tessutale per la riparazione/rigenerazione neuronale sfrutta approcci ingegneristici che utilizzano biomateriali combinati con terapie cellulari, al fine di stabilizzare il sito della lesione, rilasciare direttamente le cellule al suo interno, e fornire un ambiente adeguato, imitando le caratteristiche strutturali e fisiologiche del tessuto nativo, per la rigenerazione dei tessuti danneggiati. Molti sono i biomateriali studiati e sviluppati negli ultimi anni, ma quelli

che hanno mostrato le migliori caratteristiche sono gli idrogel, le nanofibre, i nanomateriali a base di carbonio e i peptidi auto-assemblanti.

Capitolo 2

Biomateriali usati come scaffold

2.1. Idrogel

Gli idrogel sono reti polimeriche tridimensionali, altamente idratate e insolubili in acqua, tenute insieme da legami crociati chimici e/o fisici con caratteristiche favorevoli alla crescita cellulare (Figura 2.1) [12]. Si possono suddividere in gel fisici, se i legami molecolari o le forze secondarie sono i fattori più importanti nella reticolazione, e in gel chimici, se la rete si ottiene reticolando i polimeri. Esistono due metodi per preparare idrogel chimici: la polimerizzazione tridimensionale in cui un monomero idrofilico viene polimerizzato da un agente reticolante e quindi purificato; e la reticolazione diretta di polimeri idrosolubili, che non necessitano di procedure di purificazione [8].

Hanno proprietà fisiche che consentono loro di essere iniettati nel corpo in modo non invasivo, possono essere somministrati in maniera localizzata e sono anche in grado di colmare i difetti causati da lesioni. L'alto contenuto di acqua, la porosità e la consistenza morbida degli idrogel consentono loro di trasportare ossigeno, nutrienti e fattori solubili per simulare i tessuti viventi meglio di altri biomateriali. Gli idrogel possono essere utilizzati per la somministrazione di farmaci e il rilascio di cellule. Diversi tipi di cellule possono essere incapsulati in strutture di idrogel 3D, che verranno poi impiantate nel tessuto cerebrale, oppure l'idrogel stesso può essere impiantato in uno stato pregel, che formerà quindi un gel direttamente nel cervello, consentendo una più precisa localizzazione delle cellule impiantate [8]. Le strutture 3D consentono la crescita delle cellule in un ambiente permissivo in cui vi sono sia l'ingresso di ossigeno e nutrienti sia l'uscita di prodotti di scarto. Inoltre, la struttura 3D può fungere da barriera per le cellule infiammatorie o fattori avversi nel tessuto ospite.

Sono stati sviluppati numerosi idrogel per la rigenerazione neurale, inclusi idrogel a base naturale nonché idrogel sintetici a base biodegradabile e gli idrogel non biodegradabili a base di metacrilato.

2.2. Idrogel a base naturale

Un aspetto importante da considerare quando si sviluppa un idrogel è la sua integrazione e interazione con il tessuto ospite. Pertanto, la scelta di utilizzare idrogel a base naturale, sfruttando sostanze che normalmente compaiono nell'ECM, permette di facilitare l'integrazione poiché tali sostanze possiedono determinate proprietà riconosciute dalle cellule dell'ospite e

hanno proprietà simili a quelle dei tessuti molli che stanno sostituendo. Tuttavia, questi materiali possono suscitare reazioni immunitarie nell'ospite.

Tra gli idrogel naturali più utilizzati e studiati ci sono l'agarosio, l'alginato, il collagene, la fibrina, il chitosano, l'acido ialuronico e la cheratina.

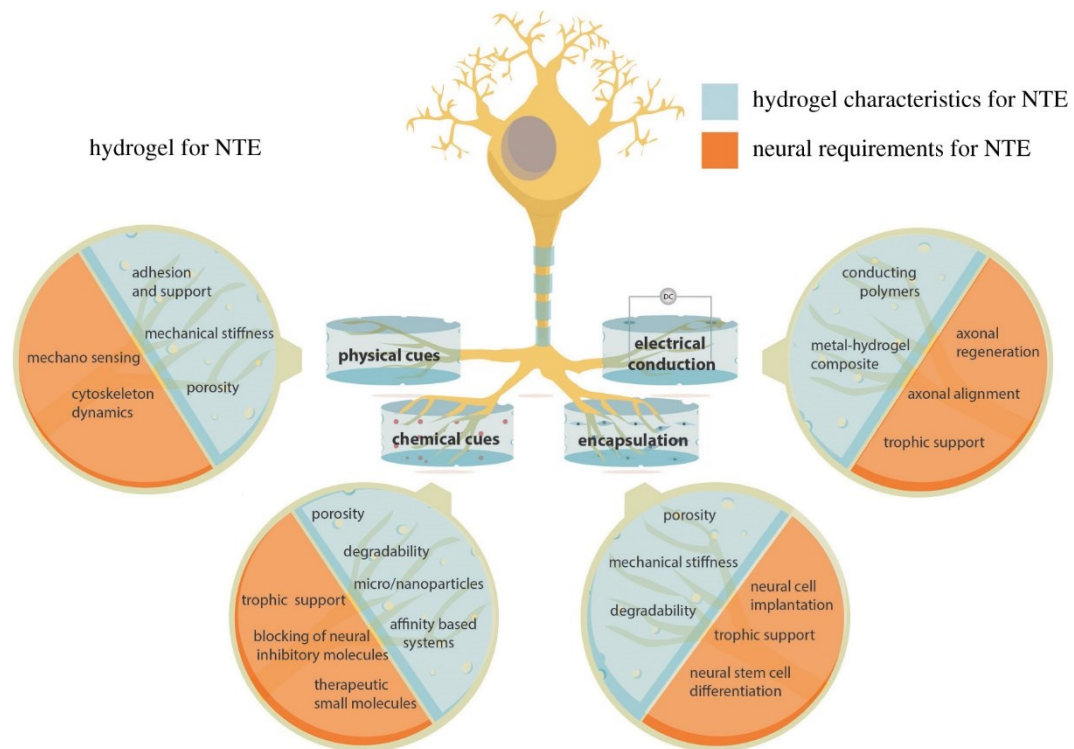


Figura 2.1. Panoramica delle diverse caratteristiche dei sistemi di idrogel che possono essere utilizzati per la crescita e la differenziazione neuronale [12].

2.2.1. Agarosio

L'agarosio è un polisaccaride di D-galattosio e 3,6-anidro-L-galattopiranosio, derivato dalle pareti cellulari delle alghe rosse, biocompatibile e con proprietà meccaniche simili ai tessuti biologici molli. Viene ampiamente utilizzato per strategie di somministrazione di farmaci in virtù della sua natura porosa. Un aspetto dei gel di agarosio che li rende particolarmente interessanti per le malattie legate al SNC è la loro capacità di polimerizzare in situ, quindi, possono riempire diversi tipi di difetti neurologici, adattandosi alla forma della lesione. Inoltre, questo tipo di idrogel ha già dimostrato la capacità di supportare l'estensione dei neuriti in vivo [13].

I gel di agarosio sono già stati sfruttati per diversi studi sulle malattie legate al sistema nervoso. In uno studio è stata progettata una matrice di agarosio che gelifica in situ a 37° C, riempiendo

in modo conforme un difetto del midollo spinale di sovraemisezione dorsale irregolare nei ratti adulti [13]. Inoltre, oltre a favorire la crescita, nello scaffold sono stati incorporati microtubuli lipidici (40 μm di lunghezza e 0,5 μm di diametro) che permettono un rilascio prolungato del fattore di crescita derivato dal cervello (BDNF), il quale ha ridotto la reattività degli astrociti e la produzione di CSPG e ha migliorato la capacità delle fibre rigeneranti di entrare nella matrice permissiva dell'idrogel fungendo da chemoattrattore. L'idrogel a base di agarosio è stato utilizzato anche per ospitare microtubi lipidici caricati con condroitinasi ABC (chABC) o con Rho GTPasi costitutivamente attive (Cdc42 e Rac1), riducendo di conseguenza la deposizione di CSPG [14, 15]. Più recentemente [16], uno scaffold di agarosio bioingegnerizzato ha dimostrato di supportare la rigenerazione dell'assone motore dopo un modello SCI di transezione completo. Inoltre, la fabbricazione di canali all'interno del gel ha permesso una crescita assonale più lineare e organizzata.

2.2.2. Alginato

Un altro polisaccaride lineare derivato dalle pareti cellulari delle alghe (alghe brune) è l'alginato, composto da unità ripetitive di β -D-mannuronato e α -L-guluronato legati con legami covalenti 1-4. L'alginato ha riscontrato un crescente interesse nell'ingegneria dei tessuti grazie alla sua biocompatibilità, bassa tossicità, basso costo e favorevoli caratteristiche di gelificazione. Tuttavia, uno dei suoi principali svantaggi è la presenza naturale di impurità, come metalli pesanti, endotossine, proteine e composti polifenolici, attribuibili alla sua origine marina. Pertanto, deve essere purificato in una procedura di estrazione a più fasi fino a una purezza molto elevata al fine di ridurre al minimo i possibili effetti avversi, comprese le risposte immunogeniche o infiammatorie. L'alginato viene utilizzato come substrato per l'incapsulamento delle cellule, il trapianto di cellule e applicazioni di ingegneria tissutale, promuovendo la rigenerazione dei nervi periferici.

Un gruppo di ricerca giapponese ha studiato a lungo l'uso dell'alginato nell'ingegneria tissutale neuronale [17]. Questi studi hanno dimostrato che i gel di alginato promuovono la rigenerazione dei nervi periferici attraverso un lungo gap, 50 mm, nel nervo sciatico del gatto e uno spazio nervoso di 10 mm nei ratti, aumentando il diametro degli assoni rigenerati. In modelli in vivo, sono stati applicati anche idrogel di alginato per la somministrazione di fattori di crescita (fattore di crescita gliale GDNF e fattore di crescita endoteliale vascolare VEGF). Inoltre, viene sfruttato per la realizzazione di scaffold ibridi, che combinano le caratteristiche biologiche dell'alginato con le proprietà meccaniche di altri biopolimeri, sia di origine naturale che

sintetica come acido ialuronico o alcool polivinilico (PVA), mostrando un grande potenziale per la rigenerazione dei nervi periferici e il trattamento delle SCI.

2.2.3. Collagene

Il collagene è una delle principali proteine presenti nell'ECM di diversi tessuti nei mammiferi. Ci sono 28 tipi noti di collagene e il più comune è il tipo I, un collagene fibrillare che fornisce struttura e supporto a tutto il corpo, comprese ossa, pelle, tendini, cartilagine e nervi. Il collagene è un biomateriale ben noto nell'ingegneria dei tessuti neurali. Infatti, è altamente biocompatibile, biodegradabile e non citotossico, permettendo quindi di supportare la crescita cellulare. Come principali svantaggi, il comportamento meccanico del collagene in vivo può essere variabile e talvolta può suscitare una risposta immunogenica, se viene utilizzato il trapianto tra specie. Altre preoccupazioni includono la variabilità nel tasso di degradazione enzimatica, rispetto alla degradazione idrolitica, e la presenza di tracce di impurità.

I gel di collagene vengono utilizzati per svariate applicazioni, a motivo anche della semplicità della realizzazione data da una modifica del pH di una soluzione di collagene. In uno studio [18] è stato utilizzato il gel di collagene di tipo I, funzionalizzato con fibronectina, come possibile riempitivo di condotti di chitosano per la rigenerazione assonale di uno spazio di 15 mm nel nervo sciatico di ratto. Lo studio ha evidenziato che l'aggiunta di fibronectina ha migliorato la rigenerazione dei nervi e che la stabilizzazione e l'organizzazione degli idrogel in strutture orientate longitudinalmente ha ulteriormente aumentato i casi in cui si è verificata la rigenerazione. Comunque, la percentuale di successo non è ancora abbastanza elevata da superare la tecnica gold standard dell'autoinnesto ma, secondo gli autori, le guide realizzate garantiscono un buon punto di partenza per nuovi studi: infatti, è stato dimostrato che il collagene è un biomateriale facile da manipolare e può essere arricchito con diverse molecole della ECM o fattori di crescita.

2.2.4. Fibrina

La fibrina è una proteina prodotta durante la cascata coagulativa, quando il fibrinogeno viene scisso dalla trombina, dando origine ai monomeri di fibrina, i quali polimerizzano spontaneamente e creano una matrice tridimensionale. Un aspetto importante della fibrina è la possibilità di controllare il processo di gelificazione variando la concentrazione di trombina utilizzata, permettendo di iniettare la fibrina allo stato liquido e formando successivamente una matrice solida in vivo. Tuttavia, ci sono anche alcuni svantaggi. I gel di fibrina di origine mammifera tendono a degradarsi rapidamente e possono essere facilmente contaminati da

patogeni derivati dal sangue o da proteine prioniche. Inoltre, alcuni rapporti mostrano che il fibrinogeno autologo di mammifero inibisce la crescita dei neuriti e attiva la formazione di cicatrici da astrociti residenti [19].

Per quanto riguarda gli studi che sfruttano la fibrina come biomateriale per la rigenerazione neurale [20], un fascio di fibrina elettrofilata allineato è stato utilizzato come riempitivo di tubi di chitosano per colmare dei difetti da 7 mm dovuti ad una lesione al nervo facciale nei conigli. È stato dimostrato che il fascio di fibrina può fornire un percorso per la migrazione delle SC durante il processo di riparazione del nervo facciale; inoltre, grazie alla graduale degradazione della fibrina a motivo dell'invasione da parte delle SC, è stato lasciato più spazio per la migrazione assonale. Alla fine, gli assoni rigenerati hanno partecipato alla formazione delle guaine mieliniche, lavorando insieme alle SC, e hanno ottenuto un recupero funzionale paragonabile agli innesti nervosi autologhi.

2.2.5. Chitosano

Il chitosano è un polisaccaride lineare derivato dalla deacetilazione chimica della chitina, il principale polisaccaride strutturale presente nei crostacei. Ha proprietà molto interessanti, come capacità di gelificazione, elevata capacità di assorbimento e biodegradabilità; è estremamente biocompatibile e presenta attività antibatterica, antimicotica e antitumorale. Il chitosano è in grado di formare un gel da solo, senza bisogno di additivi; possono formarsi idrogel a base di chitosano anche miscelandolo con altri polimeri o sali di poliolo o interagendo con molecole cariche negativamente. Gli idrogel di chitosano sono sensibili al pH, essendo solubili in soluzioni acquose diluite e precipitando in un gel a pH neutro.

Gli idrogel di chitosano hanno avuto un successo costante nell'ingegneria tessutale neuronale, mostrando adesione, interazione e sopravvivenza cellulare e crescita dei neuriti [18, 20]. Inoltre, sono stati studiati scaffold combinati di chitosano/gelatina (Cs/Gel) assemblati con nanoparticelle PEDOT (poli(3,4-etilendiossiofene), un polimero conduttivo), le quali hanno garantito un miglioramento nella conduttività elettrica, nell'idrofilicità, nelle proprietà meccaniche e nella stabilità termica, mentre è diminuito l'assorbimento d'acqua e la biodegradazione [21]. I risultati hanno suggerito che l'impalcatura Cs/Gel assemblata con PEDOT ha migliorato la crescita dei neuriti cellulari con livelli di espressione genica e proteica più elevati, rappresentando, secondo gli autori, un promettente scaffold conduttivo per l'ingegneria tessutale neurale.

2.2.6. Acido Ialuronico

L'acido ialuronico (HA) è un glicosamminoglicano presente nei tessuti extracellulari di varie parti del corpo umano, con diverse proprietà, tra cui biodegradabilità, biocompatibilità, biorisorbabilità e capacità di formare idrogel. L'HA ha riscontrato un successo diffuso nell'ingegneria dei tessuti neurali, sostenendo la crescita, la differenziazione e la proliferazione dei neuriti su diversi substrati. Gli idrogel di HA migliorano i tassi di sopravvivenza e la proliferazione dei precursori neurali, offrendo grandi premesse per le terapie di rigenerazione dei nervi periferici e approcci terapeutici per il SNC. Può essere combinato con altri biopolimeri naturali, in particolare il collagene e il chitosano, e alcuni polimeri sintetici.

2.2.7. Cheratina

La cheratina è una proteina costituita da una catena polipeptidica con struttura ad elica, in cui le catene interagiscono tra loro, organizzandosi in strutture man mano più grandi e complesse, tenute assieme tramite ponti disolfuro tra residui di cisteina di filamenti vicini. La cheratina ha dimostrato un grande potenziale come biomateriale, grazie alla sua biodegradabilità, biocompatibilità e non immunogenicità. La cheratina è stata uno dei primi biomateriali a mostrare risultati promettenti per l'ingegneria dei tessuti neurali. In particolare, gli idrogel di cheratina possono costruire strutture biocompatibili che facilitano l'adesione delle cellule neurali e la crescita assonale, soprattutto nei nervi periferici in vivo, migliorando l'attività, l'adesione e la proliferazione delle SC. Gli idrogel di cheratina hanno il potenziale per essere utilizzati clinicamente per la rigenerazione dei nervi producendo risultati a lungo termine equivalenti all'autotrapianto di nervi sensoriali.

Un recente studio [22] ha analizzato gli effetti dell'uso della cheratina estratta dai capelli umani sulle cellule correlate alla riparazione neurale attraverso un esperimento in vitro; inoltre, è stato dimostrato come l'utilizzo di una spugna di cheratina possa accelerare la riparazione della lesione del nervo sciatico nei ratti in vivo, garantendo anche un tasso di degradazione adeguato. Secondo gli studiosi, i risultati hanno evidenziato il grande potenziale della cheratina come biomateriale per la riparazione della lesione del nervo periferico, garantendo lo sviluppo di un ambiente favorevole alla rigenerazione, sovraregolando i fattori antiinfiammatori e stimolando le SC a proliferare e a secernere fattori di crescita.

2.3. Idrogel sintetici

Per quanto riguarda gli idrogel sintetici, il loro più grande vantaggio è il fatto che possono essere personalizzati per soddisfare le esigenze di una determinata applicazione. Dalle proprietà

fisiche e chimiche ai tassi di degradazione, molti aspetti della loro composizione e della loro struttura possono essere modulati al fine di migliorarne la biocompatibilità e il grado di degradazione.

Tra i principali idrogel studiati ci sono gli idrogel a base di metacrilato e gli idrogel di poli(etilenglicole) (PEG).

2.3.1. Idrogel a base di metacrilato

Gli idrogel a base di metacrilato più comuni utilizzati nell'ingegneria tessutale per la rigenerazione neuronale sono il poli[N-2-(idrossipropil)metacrilammide] (PHPMA) e il poli(2-idrossietil metacrilato e 2-idrossietil metacrilato-co-metil metacrilato) (PHEMA/PHEMA-MMA).

Gli idrogel a base di PHPMA sono biocompatibili e presentano una struttura porosa aperta che permette il trasporto di molecole sia piccole che grandi, nonché la migrazione di cellule e l'infiltrazione dei vasi sanguigni. Questi idrogel presentano anche proprietà viscoelastiche simili al tessuto neurale, hanno dimostrato di essere permissivi alla crescita di un tessuto riparativo, composto da cellule gliali, vasi sanguigni, assoni e dendriti e persino molecole della ECM, come laminina e collagene. Quando impiantato in un midollo spinale di ratto adulto e neonato, in uno dei primi studi svolti [23], l'idrogel funzionalizzato con la sequenza adesiva cellulare Arg-Gly-Asp (RGD) ha svolto un ruolo centrale nella migrazione cellulare mediata dall'adesione richiesta per la costruzione del tessuto. L'idrogel polimerico ha fornito una continuità strutturale e tridimensionale attraverso il difetto, facilitando la migrazione e la riorganizzazione delle cellule di riparazione della ferita locale, nonché lo sviluppo dei tessuti all'interno della lesione. Infine, l'idrogel ha indotto una riduzione della necrosi e ha permesso un recupero della funzione motoria.

Il PHEMA è un polimero che forma idrogel in acqua per la sua natura estremamente idrofilica; è biocompatibile ma non biodegradabile, proprietà che consente agli idrogel PHEMA di rimanere stabili anche dopo l'impianto. I polimeri PHEMA sono i materiali non degradabili più attivamente ricercati utilizzati per i canali di guida nervosa, perché possiedono proprietà meccaniche flessibili e regolabili e possono essere facilmente modellati in forme tubolari, con dimensioni, morfologia e permeabilità controllate per adattarsi ad ogni particolare applicazione nel SNC o nel SNP. Ad esempio, i tubi di idrogel PHEMA possono essere fabbricati con proprietà meccaniche simili a quelle del midollo spinale, con un modulo elastico compreso tra 200 e 600 kPa. Inoltre, poiché la sintesi di PHEMA viene effettuata a basse temperature e senza solventi tossici, è possibile incorporare composti bioattivi nello scaffold polimerico. Ad

esempio, in un recente studio [24] è stato realizzato un idrogel a doppia porosità a base di PHEMA rivestito di laminina e seminato con cellule staminali pluripotenti indotte per valutare l'effetto di questo costrutto sul recupero, l'integrazione dell'innesto nel midollo spinale danneggiato da SCI e il destino delle cellule staminali impiantate e la loro influenza sugli elementi del tessuto endogeni. In vitro, gli autori hanno scoperto che l'idrogel a doppia porosità è più adatto alla proliferazione cellulare, rispetto ai gel con un solo tipo di porosità. I pori più grandi sono adatti per l'adesione e l'espansione delle cellule, mentre i pori più piccoli consentono la diffusione dei nutrienti e non possono essere occupati dalle cellule. La terapia combinata con idrogel seminato con iPSC-NPs ha mostrato la capacità del costrutto di colmare la lesione, integrarsi nel tessuto ospite e supportare la vascolarizzazione dell'impianto e la crescita interna di assoni. L'impalcatura seminata con iPSC-NP ha influenzato il numero di neuroni TH+ endogeni e ha comunicato strettamente con assoni e astrociti endogeni. Tuttavia, ha mostrato solo un'efficacia parziale nella SCI cronica grave e, secondo gli autori, devono essere identificate ulteriori co-terapie per aumentare l'efficacia del trapianto di cellule neurali.

2.3.2. Poli(etilenglicole) (PEG)

Il PEG è un polietere biodegradabile, altamente biocompatibile e adatto per l'uso negli idrogel grazie alle sue proprietà idrofiliche, fondamentali per il trasporto di nutrienti e rifiuti, ed è anche biochimicamente inerte. Inoltre, il PEG è non immunogenico e resistente all'adsorbimento delle proteine. Oltre a questo, aiuta a sigillare le membrane cellulari dopo un danno, limitandone la morte. Tuttavia, a differenza dei polimeri naturali utilizzati negli idrogel, il PEG non è bioattivo, quindi viene spesso utilizzato in combinazione con altri polimeri. A seconda dei legami crociati creati, gli idrogel PEG possono essere progettati con velocità di degradazione variabili e possono essere utilizzati come veicoli per il rilascio di farmaci. Inoltre, possono essere ulteriormente modificati per aumentare l'adesione cellulare. È anche noto che il PEG mostra tassi di eliminazione rapidi ed è già stato approvato per un'ampia gamma di applicazioni biomediche, inclusa la SCI.

La crescita delle cellule neuronali su piattaforme PEG migliora la sopravvivenza, la proliferazione e la differenziazione delle cellule neurali. Soprattutto, l'uso di idrogel PEG 3D, che rispecchiano strettamente la rigidità del cervello nativo, favorisce una maggiore attività metabolica e proliferazione delle cellule e tassi più bassi di apoptosi. La natura versatile e non tossica del PEG ha portato alla realizzazione di test preclinici e somministrazioni per via endovenosa dopo un trauma cranico. Dopo una grave lesione cerebrale traumatica, la somministrazione endovenosa di PEG ha smorzato la perdita di cellule cerebrali e ha rallentato

la degenerazione degli assoni feriti [25]. Inoltre, il PEG ha mostrato risultati promettenti in seguito a lesioni del midollo spinale, accelerando e migliorando significativamente il processo di risigillatura e ripristinando l'integrità meccanica dopo la compressione della membrana neuronale. Ha anche mostrato una maggiore crescita e migrazione cellulare insieme a un migliore recupero funzionale nei ratti dopo la resezione del midollo spinale utilizzando un'impalcatura elettrofilata con acido poli-lattico-co-glicolico (PLGA)/PEG funzionalizzata con cellule staminali neurali (NSC) [26]. I risultati di tale studio hanno dimostrato che lo scaffold ha garantito una corretta differenziazione e proliferazione delle NSC in cellule neurali e neuriti in vitro, senza rischi di necrosi o apoptosi interna alla struttura. Successivamente, è stato realizzato un costrutto cilindrico che è stato impiantato nel sito della lesione, garantendo dopo due settimane dall'operazione una corretta integrazione col tessuto nativo e la differenziazione delle cellule staminali in vivo.

2.4 Nanoparticelle

Uno dei principali problemi nel trattamento delle patologie del SNC è la permeabilità della barriera emato-encefalica (BBB), che impedisce ai farmaci somministrati di raggiungere livelli terapeutici efficaci nel cervello. Quindi, sarebbero necessarie dosi sistemiche maggiori, portando però effetti avversi. Per questo motivo sono necessarie strategie in grado di aumentare la loro concentrazione nel cervello. La nanotecnologia, che consiste nell'uso di materiali o dispositivi su scala nanometrica (1-100 nm), è emersa negli ultimi anni come un approccio promettente per il trattamento di diverse patologie legate al sistema nervoso. Esistono diversi tipi di dispositivi nanotecnologici come nanoparticelle, nanofibre, nanotubi, nanosfere e nanogel.

Le nanoparticelle (NP) sono una delle nanostrutture preferite per le loro caratteristiche: piccole dimensioni, ampia superficie ed elevati rapporti superficie/volume. Possono essere composte da diversi materiali come ceramici, metalli, ossidi, sali e polimeri. Esse sono in grado di proteggere gli agenti terapeutici, attraversare la BBB e fornire efficacemente farmaci nelle aree danneggiate (Figura 2.2).

Le NP di silice, in particolare le NP di silice mesoporosa con una dimensione dei pori di 2-50 nm, sono le più utilizzate a motivo della loro ampia area superficiale e del volume dei pori; inoltre è facile controllarne le dimensioni e hanno una buona biocompatibilità. Anche le NP a base di gelatina (una proteina denaturata ottenuta per idrolisi del collagene animale con soluzione acida o alcalina) sono in particolare utilizzate per migliorare la biocompatibilità degli scaffold polimerici per l'ingegneria dei tessuti neurali. Ad esempio, uno scaffold ibrido

gelatina/chitosano/PEDOT ha migliorato la crescita dei neuriti delle cellule PC12 e ha promosso l'adesione e la proliferazione delle cellule neuronali [21]. Anche microsfeere e nanoparticelle di chitosano hanno riscontrato successo per il rilascio di farmaci antitumorali, fattori di crescita e farmaci per il SNC. La combinazione delle proprietà del chitosano con la capacità delle nanoparticelle di trasportare diverse sostanze in siti specifici è stata testata in uno studio sulle nanoparticelle magnetiche funzionalizzate con chitosano (CMNP) per la riabilitazione delle lesioni nervose periferiche utilizzando un modello sperimentale in vivo [27]. Il trattamento con CMNP è stato somministrato quotidianamente, per via orale, per 21 giorni a ratti sottoposti a lesione del nervo sciatico destro e confrontati con un gruppo di controllo. Lo studio ha evidenziato la capacità delle CMNP di garantire una riabilitazione funzionale ottimale statisticamente significativa, una risposta ridotta alla valutazione del comportamento simile al dolore (il dolore non può essere misurato direttamente ma può essere valutato da comportamenti “simili al dolore”, ad esempio il ritiro della coda o del piede del roditore da uno stimolo nocicettivo, tramite il test di Randall-Selitto) e un aumento del peso corporeo totale rispetto al gruppo di controllo. Infine, altri biomateriali sfruttati per il rilascio di farmaci attraverso la BBB sono i polimeri sintetici, ad esempio le microsfeere PLGA.

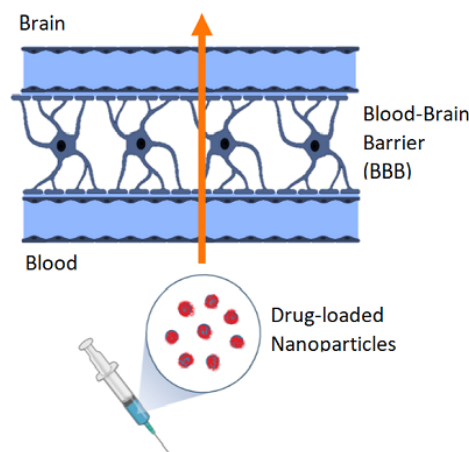


Figura 2.2. L'uso di nanoparticelle per il rilascio di farmaci attraverso la barriera ematoencefalica [27].

2.5. Nanofibre

Come riportato in precedenza, per l'ingegneria tessutale è fondamentale che gli scaffold imitino il tessuto nativo. L'elettrofilatura viene utilizzata per imitare la struttura fibrosa del tessuto cerebrale; è un processo mediante il quale un polimero in soluzione o fuso può essere filato, grazie ad un campo elettrico ad alto potenziale. In particolare, l'elettrofilatura è stata applicata

in modo intensivo per la sua semplicità, riproducibilità e diversità nel produrre nanofibre con vari diametri e con diverse caratteristiche topografiche.

Uno dei vantaggi delle nanofibre è l'ampio rapporto superficie/volume, che le rende una matrice bioattiva ottimale per l'adesione cellulare, il caricamento delle molecole e la funzionalizzazione al fine di fornire caratteristiche biochimiche e biofisiche migliorate. Una caratteristica fondamentale che devono avere le nanofibre è il corretto allineamento, rendendole particolarmente utili per la ricrescita degli assoni. Infatti, si è riscontrato un effetto migliore nelle nanofibre allineate, rispetto a quelle poste casualmente, perché possono imitare l'architettura del tessuto nativo. In alcuni studi [28], si è scoperto che le fibre di acido poli(L-lattico) (PLLA) con diametri nell'intervallo nanometrico ottenute dall'elettrofilatura di polimeri naturali sono in grado di promuovere l'adesione, la crescita, la sopravvivenza e la proliferazione delle cellule staminali neurali (NSC), ma, cosa più importante, le nanofibre allineate forniscono una guida direzionale, dirigendo la crescita dei neuriti e la migrazione delle cellule gliali lungo l'orientamento allineato.

Molti materiali possono essere utilizzati per produrre nanofibre, portando all'ottenimento di numerosi scaffold con diverse caratteristiche interessanti. Le nanofibre possono essere composte da materiali sintetici oppure essere generate a partire da composti naturali. Un biomateriale che può essere facilmente elettrofilato è la cheratina, che, in combinazione con altri polimeri non naturali con caratteristiche meccaniche più elevate, esalta la biocompatibilità con ottimi risultati. Nell'ingegneria dei tessuti neurali, uno scaffold nanofibroso elettrofilato di alcool polivinilico (PVA)/cheratina ha consentito l'adesione, la proliferazione e la vitalità delle cellule gliali in vitro, confermando i risultati ottimali osservati in altri campi dell'ingegneria tessutale [29]. Anche i fasci di fibrina elettrofilata allineati hanno attirato sempre più l'attenzione perché in grado di simulare la struttura della matrice extracellulare nervosa, garantendo in combinazione con altri materiali una buona biocompatibilità e un miglior recupero funzionale [20]. Infine, un altro biomateriale ampiamente utilizzato è il chitosano. In uno studio [30], degli scaffold di idrogel in fibra di chitosano allineati sono stati fabbricati mediante elettrofilatura e allungamento meccanico e sono stati funzionalizzati con una miscela di peptidi RGI/KLT biologicamente attivi (peptidi che imitano rispettivamente il BDNF e il fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF)) per costruire un'impalcatura nervosa composta per riparare i difetti del nervo sciatico di 15 mm nei ratti. Il costrutto ha permesso l'orientamento, la proliferazione e la secrezione di fattori neurotrofici da parte delle SC e non solo ha migliorato la rigenerazione dei nervi, ma ha anche promosso la penetrazione vascolare.

A 12 settimane, lo scaffold realizzato ha facilitato la rigenerazione dei nervi e il recupero funzionale nei ratti.

Per quanto riguarda i polimeri sintetici, il policaprolattone viene molto sfruttato. Il PCL può essere combinato con polimeri naturali o rivestito con cellule per migliorarne la biocompatibilità, le proprietà di adesione cellulare e promuovere la rigenerazione delle fibre nervose o assistere la crescita direzionale degli assoni rigenerati nei nervi periferici. Una combinazione di PCL, nanofibre di carbonio (CNF) e collagene è stata testata per la realizzazione di un condotto di guida nervosa (NGC) [31]. Un NGC è un efficace sostituto dell'autoinnesto poiché preclude l'invasione di tessuto fibroso nello spazio tra due monconi, inoltre può intrappolare e arricchire l'interno del canale di fattori neurotrofici e creare un ambiente permissivo per la rigenerazione dei nervi (Figura 2.3). Lo scaffold elettrofilato realizzato dagli autori ha effetti notevoli in termini di comportamento cellulare come l'orientamento e la differenziazione. Il condotto nervoso PCL/CNF ha migliorato la rigenerazione del nervo e mitigato l'atrofia muscolare. Gli autori attribuiscono l'efficacia del condotto alla conduttività elettrica intrinseca del CNF ma sottolineano che andrebbero svolti ulteriori indagini sui potenziali effetti avversi degli CNF.

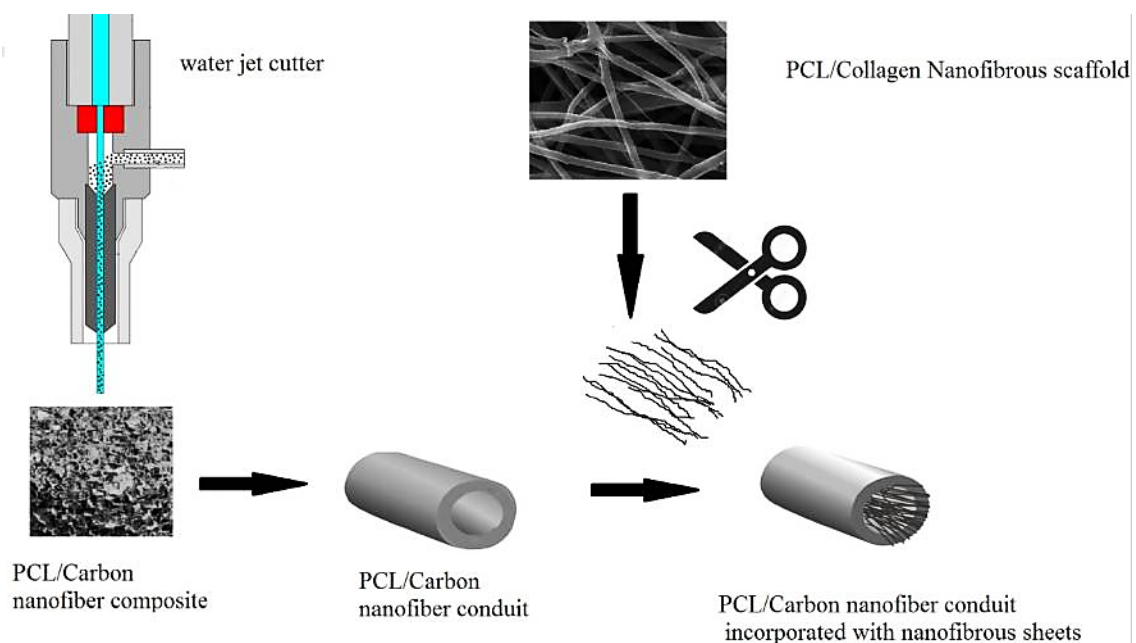


Figura 2.3 Illustrazione schematica della produzione dei canali di guida neurale [31].

In uno studio simile [32] sul difetto del nervo sciatico di ratto da 10 mm, è stato dimostrato che l'NGC a spirale a base di PCL con nanofibre allineate soddisfaceva i requisiti di trasporto meccanico e nutritivo per la rigenerazione del nervo. Un canale a spirale altamente poroso ha

aumentato le aree superficiali per l'invasione e la proliferazione cellulare e ha aiutato la ricrescita del tessuto nervoso. Inoltre, le nanofibre elettrofilate a spirale hanno fornito uno spunto per garantire che gli assoni rigenerati seguano la distanza più breve attraverso lo spazio verso il moncone del nervo distale. Il tubo nanofibroso esterno può prevenire l'infiltrazione di tessuto cicatriziale e ha fornito una resistenza meccanica duratura durante l'intera rigenerazione del nervo. Infine, integrando la laminina alla spirale NGC si generano un macroambiente adatto, e caratteristiche di trasporto e resistenza meccanica ideali per migliorare la velocità di rigenerazione del nervo attraverso un difetto nervoso di dimensioni critiche (15 mm) entro 12 settimane. La possibilità di iniettare nanofibre può aprire quindi nuove possibilità per la rigenerazione neuronale, anche in combinazione con altre tecniche.

2.6. Nanomateriali a base di carbonio

Il tessuto neurale e le cellule neurali hanno la proprietà unica di generare e trasmettere stimoli elettrici. Infatti, i canali voltaggio-dipendenti possono essere modulati dalla stimolazione elettrica, influenzando non solo l'attivazione dei neuroni, ma anche la proliferazione, la migrazione e la funzionalità cellulare. Per questo motivo, gli stimoli elettrici sono ora considerati uno degli strumenti più promettenti per la rigenerazione del tessuto neurale. Uno dei problemi principali è lo sviluppo di un biomateriale elettroattivo con un'eccellente biocompatibilità, che dovrebbe supportare la crescita cellulare e contribuire al trasferimento del segnale elettrico. I materiali a base di carbonio (ad es. grafene e nanotubi di carbonio (CNT)) svolgono un ruolo fondamentale nella rigenerazione neurale a motivo delle loro eccezionali proprietà fisiche, chimiche e meccaniche e della loro conducibilità elettrica.

Il grafene è una forma allotropica del carbonio costituito da un singolo strato di atomi di carbonio disposti in un reticolo esagonale bidimensionale; in particolare, i nanomateriali della famiglia del grafene sono stati identificati come nuovi biomateriali per diverse applicazioni biomediche come nanocarrier, biosensori e per la rigenerazione neurale delle cellule eccitabili. Il grafene conduce efficacemente calore ed elettricità, è quasi trasparente, battericida e antivirale ed ha una bassa tossicità cellulare. Per migliorare l'adesione cellula-substrato, il grafene viene rivestito con uno strato di prerivestimento come laminina, collagene, Matrigel e poli-L-lisina. Fattori importanti da considerare sono la topografia superficiale e le proprietà meccaniche del microambiente: ad esempio, un modello a griglia promuove la differenziazione neurale, mentre un modello quadrato promuove la differenziazione gliale. È stato studiato un modello di linea molto preciso con una larghezza di 15 μm e una spaziatura di 8 μm che migliora l'adesione e la crescita dei neuroni ipocampali primari, ma anche influenza la direzione della

crescita dei neuriti [33]. I modelli precedentemente descritti sono composti da uno strato 2D di grafene, ma questo materiale può essere anche utilizzato per la generazione di scaffold 3D. A seconda che il grafene venga utilizzato in 2D o 3D, è stata segnalata una tossicità cellulare diversa della matrice; gli scaffold di grafene 3D inducono una neuroinfiammazione molto più lieve rispetto ai film 2D, consentendo una migliore biocompatibilità. Esempi di scaffold 3D a base di grafene sono le cosiddette schiume di grafene che stimolano e accelerano la differenziazione e la proliferazione delle NSC. La rigenerazione neurale dei materiali di grafene è stata testata in un piccolo numero di modelli in vivo. Un'impalcatura nanofibrosa a base di grafene in un modello di ratto con una lesione del nervo sciatico ha portato alla rigenerazione del nervo e la conseguente funzionalità erano simili al gold standard dell'autotrapianto [34].

I CNT sono fogli di grafene arrotolati in tubi cilindrici con una gamma di diametri di 0,4-2 nm e con lunghezze che vanno da centinaia di nanometri a micrometri; presentano una straordinaria conduttività termica e proprietà meccaniche ed elettriche ottimali. Possono essere suddivisi in CNT a parete singola (SWCNT) e CNT a parete multipla (MWCNT), a seconda della loro geometria. Sebbene molti studi abbiano cercato di migliorare la biocompatibilità dei CNT, hanno molti problemi di sicurezza, causando potenziale stress ossidativo, produzione di radicali liberi, accumulo di prodotti perossidativi, danni al DNA e infiammazione. Tali problemi di biocompatibilità sono importanti ostacoli da superare per le applicazioni potenzialmente ampie dei CNT nella terapie per il SNC. Al contrario, a motivo delle loro caratteristiche elettriche, rappresentano uno strumento promettente per la rigenerazione dei nervi. I CNT sono particolarmente utilizzati come additivi nei biomateriali per fornire proprietà conduttive ai materiali elettricamente inerti. In alcuni lavori, i ricercatori hanno applicato stimoli elettrici all'impalcatura per migliorare l'effetto dei CNT. Ad esempio, uno scaffold composto da glicole polietilenico e MWCNT stimolato elettricamente ha migliorato la crescita e la lunghezza dei neuriti di 2 e 1,8 volte [34]. Allo stesso tempo, i CNT possono essere utilizzati anche senza dare stimolazione elettrica in quanto forniscono al biomateriale una differenza di potenziale che si è rivelata sufficientemente efficace da consentire la crescita dei neuriti e la rigenerazione neurale e ciò è fondamentale per l'ingegneria tessutale poiché una stimolazione esterna può essere facilmente fornita in vitro, mentre è difficile da ottenere in vivo. Data la possibile tossicità dei CNT, ci sono poche prove sulle funzioni in vivo dei biomateriali interfacciati con essi. In uno dei primi studi svolti in vivo [36], sono stati utilizzati dei condotti intrecciati di CNT basati su microfibre di vetro fosfato combinate con scaffold polimerici per la rigenerazione del nervo sciatico di ratto sezionato da 10 mm. Gli studiosi hanno scelto di legare i CNT alla superficie per garantire una tossicità minima ma allo stesso tempo una buona conducibilità elettrica. I

risultati hanno mostrato un miglioramento del numero di assoni che attraversano la lesione, garantendo anche un recupero elettrofisiologico delle funzioni motorie. Tuttavia, i risultati non superano quelli dell'autoinnesto ma, secondo gli autori, attraverso ulteriori studi per sviluppare condotti nervosi con migliori proprietà morfologiche ed elastiche sarà possibile raggiungere un risultato analogo al gold standard.

2.7. Peptidi auto-assemblanti

I peptidi auto-assemblanti (SAP) comprendono brevi sequenze di amminoacidi o sequenze di amminoacidi ripetute che si assemblano per formare nanostrutture come tubi, barre e fogli, consentendo l'esposizione delle catene laterali caratteristiche di ogni peptide sulla superficie di queste strutture, definendo le principali proprietà del complesso formato. Queste strutture hanno diverse attività fisico-chimiche e biochimiche a seconda della morfologia, delle dimensioni e dell'accessibilità della superficie attiva. L'autoassemblaggio dei peptidi può essere controllato da pH, forza ionica, temperatura o trigger enzimatici. I vantaggi di queste strutture sono la loro biocompatibilità e la facilità di sintesi.

Esistono diversi tipi di peptidi auto-assemblanti. Gli elementi costitutivi più semplici di queste strutture sono i dipeptidi, che possono assemblarsi in strutture ordinate su scala nanometrica. Altri sono invece caratterizzati da una struttura anfifilica, con una coda idrofobica e una testa idrofilica. Quando disciolti in acqua, questi peptidi si assemblano per ridurre al minimo il contatto della coda con l'acqua, generando strutture simili funzionalmente alle micelle lipidiche presenti sullo strato lipidico delle cellule. La modifica più comune dei peptidi con una coda idrofobica e una testa idrofilica è il collegamento con una catena alchilica idrofobica, formando una struttura 3D, simile a ciò che accade durante il ripiegamento delle proteine. Questi peptidi modificati formano strutture come micelle, vescicole, nanofibre e nanotubi. I peptidi ionici-complementari sono caratterizzati da una disposizione alternata di residui carichi negativamente e positivamente, mentre i peptidi ciclici sono composti da amminoacidi che formano una struttura cilindrica. I peptidi ciclici consentono strutture più stabili rispetto a quelle composte da peptidi lineari. Molti studi [23, 37] prevedono anche la funzionalizzazione con IKVAV (Ile-Lys-Val-Ala-Val) e RGD (Arg-Gly-Asp). RGD è altamente correlato alla crescita degli assoni adulti. IKVAV promuove selettivamente la differenziazione neuronale e l'adesione cellulare e inibisce la differenziazione e l'adesione delle cellule gliali. Negli ultimi anni, i peptidi auto-assemblanti sono stati utilizzati in molti campi per quanto riguarda le patologie del sistema nervoso; ad esempio, nella somministrazione di farmaci e nella rigenerazione neuronale.

Capitolo 3

Criteri di progettazione degli scaffold

3.1. Biocompatibilità e biodegradabilità

Per permettere la rigenerazione neuronale dopo una lesione nel SNC o nel SNP, è fondamentale generare un ambiente adatto. Ciò comporta generalmente l'utilizzo di scaffold di biomateriali che imitano da vicino l'ambiente nativo. Lo scaffold deve soddisfare diversi criteri di progettazione ed è importante considerarne la biocompatibilità, la biodegradabilità, la permeabilità/porosità, le proprietà biomeccaniche, l'adesione e migrazione cellulare e il rilascio di fattori di crescita o inibitori.

La biocompatibilità dello scaffold è la primaria caratteristica da considerare, poiché il biomateriale utilizzato deve supportare le funzioni cellulari sia per le popolazioni cellulari native che per le cellule che potrebbero essere trapiantate, senza suscitare reazioni avverse o di rigetto da parte dell'ospite. Quando il materiale entra in contatto con il tessuto dell'ospite, non dovrebbe indurre emolisi, distruggere componenti del sangue, causare coagulazione e formazione di trombi, avere effetti tossici sul tessuto circostante o suscitare una risposta immunitaria.

Il biomateriale impiegato deve inoltre avere una diversa biodegradabilità in base alle applicazioni previste. I materiali biodegradabili o biorisorbibili evitano la necessità di un secondo intervento chirurgico di recupero, che potrebbe risultare particolarmente critico se le cellule trapiantate hanno stabilito connessioni neurali e si sono integrate con il tessuto ospite. I biomateriali non degradabili sono più adatti per situazioni in cui è richiesto l'isolamento immunitario di cellule allogene e xenogene. È importante comunque sottolineare che sia i materiali di partenza che i prodotti di degradazione devono essere non tossici, non immunogenici e non cancerogeni e che i biomateriali, se non degradabili, devono essere biocompatibili in modo tale che l'impianto permanente non causi complicazioni. Inoltre, l'impianto a lungo termine può provocare una risposta cronica da corpo estraneo che porta a fibrosi e astrocitosi intorno allo scaffold.

Anche il controllo del tasso di degradazione è fondamentale per il successo della rigenerazione. Le cellule trapiantate richiedono un supporto strutturale, poiché le proprietà meccaniche possono influenzare la sopravvivenza cellulare, la differenziazione e quindi il potenziale rigenerativo. Idealmente, il tasso di degradazione del materiale dovrebbe corrispondere strettamente al tasso di rigenerazione tissutale, in cui lo scaffold dovrebbe rimanere intatto

affinché le cellule trapiantate secernano la propria matrice extracellulare e gli assoni per rigenerarsi attraverso il sito della lesione. Anche nell'uso dei NGC, il controllo del tasso di degradazione è fondamentale [38]. I NGC ideali dovrebbero mantenere la loro forma, attendere che l'assone cresca dal moncone prossimale attraverso il difetto e rinnervare la via del nervo distale, quindi iniziare a degradarsi gradualmente e ridurre al minimo la pressione sui tessuti circostanti. Se il tasso di degradazione è troppo veloce, può causare un'inflammatione locale. Se il tasso di degradazione è troppo lento, l'NGC comprime il nervo, portando al rigetto immunitario cronico.

3.2. Permeabilità e porosità

La permeabilità e la porosità sono importanti per consentire lo scambio di ossigeno, nutrienti e altri fattori, per influenzare in modo significativo il comportamento delle cellule trapiantate, per consentire le infiltrazioni delle cellule ospiti benefiche ed evitare le infiltrazioni di quelle nocive. Per la PNI, la struttura dominante degli scaffold neurali sono i condotti tubolari, che di solito consistono in un guscio esterno semipermeabile che promuove lo scambio di nutrienti, rifiuti e gas tra lo spazio di rigenerazione e il tessuto ospite e le matrici interne che possono supportare le cellule trapiantate. Gli effetti delle dimensioni dei pori sulla rigenerazione dovrebbero essere considerati con attenzione al fine di isolare l'invasione delle cellule che formano il tessuto cicatriziale fibrotico. I primi studi sulla riparazione del PNI con condotti cavi suggeriscono che le dimensioni dei pori di circa 5-10 μm sembrano essere ottimali per facilitare lo scambio di nutrienti e rifiuti riducendo al minimo l'infiltrazione di tessuto fibrotico in vivo [39]. Successivamente, alcuni ricercatori ritennero più adatte dimensioni dei micropori di 10-38 μm e una porosità dell'80% [40]. Comunque, è sempre importante considerare quali possano essere gli effetti della dimensione dei pori in relazione alle proprietà del materiale.

Come evidenziato nei capitoli precedenti, rispetto al PNI, la LM non può rigenerarsi spontaneamente, a causa di lesioni secondarie che possono portare alla formazione della cicatrice gliale. È stato progettato uno scaffold a due strati basato su PLGA che simulava l'architettura del midollo spinale per studiare la riparazione dell'emisezione laterale toracica nei ratti [41]. La porzione interna dello scaffold mirava a emulare la materia grigia, aveva dimensioni dei pori comprese tra 250 e 500 μm ed era seminata con NSC; mentre la porzione esterna emulava la sostanza bianca con lunghi pori orientati assialmente che consentivano il trasporto di fluidi inibendo la crescita del tessuto cicatriziale. Questa struttura ha mostrato miglioramenti significativi nella rigenerazione; il guscio esterno dello scaffold ha inibito la crescita interna di una varietà di tipi di cellule, inclusi i fibroblasti; inoltre, ha garantito una

ridotta infiltrazione di astrociti reattivi, che a sua volta ha ridotto la formazione di cicatrici gliali. Il miglior recupero funzionale può essere in parte attribuito alla riduzione della formazione di cicatrici e della cavità della lesione.

La porosità della matrice luminale dovrebbe fornire un ambiente favorevole non solo per promuovere la rigenerazione degli assoni ma anche per migliorare la vitalità e la funzione delle cellule trapiantate. Per quanto riguarda la PNI [42], uno studio ha valutato gli effetti della dimensione dei pori (di scala nano e micrometrica) sugli NGC (Figura 3.1). Per raggiungere questo obiettivo, è stata fabbricata una membrana in policaprolattone (PCL)/Pluronic F127 asimmetricamente porosa (nano e micropori su entrambe le superfici), nella quale è stato immobilizzato il fattore di crescita NGF. I risultati hanno dimostrato che una dimensione dei pori su scala nanometrica (circa 100 nm) ha comportato una densità assonale più elevata, garantendo un ricollegamento tra i monconi prossimale e distale a 4 settimane. Al contrario, negli NGC microporosi la rigenerazione del nervo è stata impedita.

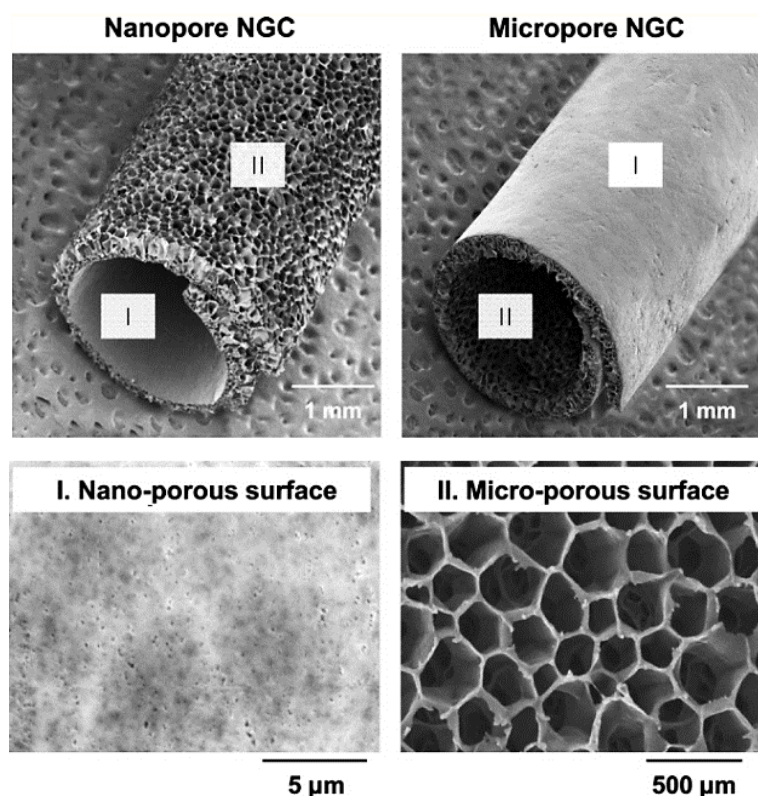


Figura 3.1 Fotografie al microscopio elettronico a scansione che mostrano l'aspetto grossolano e la morfologia superficiale di Nanopore NGC e Micropore NGC [42].

Nel complesso, questi dati suggeriscono che la permeabilità/porosità del guscio esterno e della matrice interna dell'impalcatura neurale potrebbero servire a scopi diversi. Considerando che il

guscio esterno deve prevenire l'infiltrazione dei tessuti che potrebbe causare cicatrici, la matrice interna dovrebbe promuovere la rigenerazione degli assoni e mantenere la vitalità e la funzione delle cellule trapiantate. Sebbene molti studi abbiano evidenziato gli effetti della dimensione dei pori sulle cellule trapiantate in vitro, ne sono necessari ulteriori per determinare la porosità ottimale per migliorare i risultati funzionali in vivo.

3.3. Proprietà biomeccaniche

Nella selezione dei materiali per gli scaffold neurali, è anche importante considerare se le proprietà biomeccaniche, come la rigidità e la flessibilità, sono adatte. Per le lesioni del SNP, l'impalcatura tubulare deve sostenere uno stress fisiologico in vivo sufficiente per supportare la rigenerazione; non dovrebbe solo avere un certo grado di protezione anti-compressione, ma anche avere un certo grado di flessibilità per resistere alle forze di trazione e torsione generate durante le attività fisiologiche [38]. Infatti, i movimenti dei pazienti possono causare il danno di un condotto morbido; materiali troppo rigidi possono invece provocare attorcigliamenti quando piegati e inibire la crescita degli assoni. Anche il modulo elastico del biomateriale può influenzare significativamente il comportamento cellulare. In vitro i dati suggeriscono che la rigidità e l'elasticità del substrato possono avere effetti importanti sul comportamento delle SC.

3.4. Struttura superficiale

La struttura superficiale è un altro parametro importante da considerare nella progettazione dello scaffold. In particolare, la superficie micro-modellata orientata longitudinalmente è la migliore per l'allineamento cellulare e la direzionalità degli assoni, poiché rispecchia la scala di grandezza tipica dell'ambiente del sistema nervoso. I principali tipi di elementi di guida topografica sono microscanalature alternate e fibre orientate parallelamente, che influiscono sulla crescita dei neuriti, sulla morfologia delle cellule neurali e sulla differenziazione. Le microscanalature alternate possono anche influenzare gli allineamenti delle cellule e degli assoni negli scaffold. Anche i microsolchi influenzano la differenziazione verso le linee neurali; infatti, in un modello di lesione del nervo sciatico di ratto da 10 mm, è stato dimostrato che i condotti con microsolchi in PLA seminati con NSC hanno migliorato il recupero funzionale rispetto ai condotti in silicone e agli autotrapianti 6 settimane dopo l'impianto [43]. Anche il numero di assoni mielinizzati e l'area media degli assoni sono risultati simili a quelli dell'autotrapianto. Inoltre, le NSC erano allineate lungo le caratteristiche longitudinali del condotto ed è stato osservato un aumento dell'espressione di fattori di crescita nell'arco di 72 ore.

Un altro tipo di guida topografica sono le fibre orientate parallelamente. Lo studio sui diametri delle fibre è importante per la differenziazione delle NSC in tipi di cellule gliali neuronali o del SNC [44]. Le NSC di ratto hanno dimostrato un aumento del 20% nella differenziazione neuronale su nanofibre di polietersulfone di 749 nm, mentre la differenziazione degli oligodendrociti era più alta su fibre con diametro di 283 nm. Inoltre, quando il diametro delle fibre è diminuito, la proliferazione e la migrazione cellulare sono aumentate mentre l'aggregazione cellulare è diminuita. Al contrario, l'allineamento delle fibre è fondamentale per l'orientamento cellulare e l'allineamento dei neuriti.

Un altro parametro superficiale da considerare è la rugosità. Una rugosità elevata (85-200 nm) supporta la generazione di assoni più lunghi e più escrescenze/rami di neuriti rispetto a quella di una superficie più liscia (rugosità superficiale di 6–50 nm). Infine, è importante notare che superfici più idrofiliche mostrano un tasso di adesione cellulare più elevato e tendono ad assorbire più proteine [38].

Capitolo 4

Ruolo delle biomolecole nella rigenerazione neuronale

4.1. Adesione cellulare attraverso proteine del ECM

Per migliorare le interazioni cellula-materiale e migliorare i risultati soprattutto nel caso di trapianto cellulare, diverse molecole biologiche, proteine della ECM e fattori di crescita possono essere incorporate negli scaffold. Queste biomolecole possono migliorare la sopravvivenza delle cellule trapiantate, influenzare la differenziazione e, infine, migliorare la rigenerazione dei nervi.

Molti dei biomateriali generalmente utilizzati non presentano caratteristiche intrinseche pro-adesive, per questo l'adesione cellulare viene mediata sfruttando gli effetti delle proteine della ECM o delle sequenze peptidiche funzionali reticolate allo scaffold. L'adesione cellulare all'ECM è principalmente dovuta alle interazioni tra le integrine e le sequenze pro-adesive della ECM attraverso il citoscheletro di actina intracellulare, che può influenzare la segnalazione intracellulare per la sopravvivenza, la proliferazione e la migrazione. Le interazioni delle integrine con la sequenza RGD (Arg-Gly-Asp) consentono l'assemblaggio dell'actina e influenzano la migrazione cellulare.

Le proteine della ECM dell'ambiente neurale nativo sono spesso utilizzate, poiché hanno dimostrato di migliorare la rigenerazione neurale in vitro e in vivo. Una varietà di proteine della ECM è stata utilizzata per migliorare l'adesione cellulare negli scaffold di biomateriali, tra cui laminina, fibronectina, fibrina e collagene [18, 24, 32]. La laminina è una delle proteine che attiva il β -recettore dell' α 1-integrina ed è un attore fondamentale della lamina basale del nervo periferico, necessaria per promuovere la migrazione delle cellule di Schwann e l'allungamento assonale. Tuttavia, una laminina concentrata in maniera impropria può ostacolare la rigenerazione dei nervi.

La fibronectina è una grande glicoproteina presente nel plasma e anche un'importante componente della matrice extracellulare; supporta l'adesione di numerosi tipi di cellule e anche la crescita dei neuriti dallo sviluppo dei neuroni del SNP e del SNC.

D'altra parte, l'uso delle proteine della ECM presenta diversi limiti. Sebbene il pre-rivestimento delle proteine sugli scaffold neurali sia relativamente semplice, il tasso di funzionalizzazione e il mantenimento della funzionalità della proteina nativa dopo l'adsorbimento sono difficili da

controllare. Un'altra limitazione dell'utilizzo di proteine della ECM di derivazione naturale è la mancanza di fonti cliniche per la reperibilità di alcune di esse, ad esempio la laminina.

L'utilizzo di brevi sequenze peptidiche funzionali derivate da queste proteine è una valida alternativa in molti casi. Le principali sequenze peptidiche ben studiate derivate da proteine della ECM sono RGD, YIGSR (Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg) e IKVAV; esse hanno dimostrato la capacità di promuovere la crescita dei neuriti in vitro e in vivo [23, 37].

4.2. Rilascio di fattori di crescita

Un'altra categoria di segnali biochimici incorporati nello scaffold sono i fattori di crescita (GF). I GF nervosi sono molecole che vengono rilasciate naturalmente nei processi di lesione e determinano una maggiore rigenerazione dei nervi [3]. Pertanto, è importante controllare il loro rilascio, che è vitale per la crescita, la differenziazione e l'espansione dei nervi. Vengono immobilizzati nello scaffold per migliorare le funzioni delle cellule incorporate e promuovere l'infiltrazione delle cellule ospiti. In particolare, migliorano la sopravvivenza delle cellule trapiantate, promuovono la differenziazione neuronale delle cellule staminali e migliorano le capacità rigenerative delle SC.

I fattori di crescita comunemente incorporati negli scaffold neurali includono il fattore di crescita nervoso (NGF), i fattori neurotrofici derivati dal cervello (BDNF), la neurotrofina-3 (NT-3), il fattore neurotrofico derivato dalla linea cellulare gliale (GDNF), il fattore neurotrofico ciliare (CNTF) e i fattori di crescita dei fibroblasti (FGF).

Un parametro importante da considerare quando si incorporano le biomolecole nello scaffold è il modello di distribuzione, che può essere uniforme o direzionale. Ad esempio, è stato dimostrato che l'NGF, distribuito all'interno di un NGC in quattro strati a concentrazioni crescenti del fattore di crescita, migliora la mielinizzazione assonale e la densità assonale in gap più lunghi (> 20 mm) rispetto al modello uniformemente distribuito negli idrogel, il quale, invece, promuove efficacemente la rigenerazione dei nervi su spazi nervosi di 10 mm [45]. Altri parametri da considerare sono la lunghezza e le concentrazioni del GF necessarie per ottenere una risposta chemiotattica efficace a seconda del gap della lesione. Infatti, alte concentrazioni di fattori di crescita possono anche avere un impatto negativo sulla crescita assonale.

4.2.1. Fattore di crescita nervoso NGF

Il fattore di crescita nervoso (NGF) è stata la prima neurotrofina scoperta negli anni '50 da Rita Levi-Montalcini e Viktor Hamburger in colture di sarcoma di topo in vitro [46]. Studi successivi hanno scoperto il ruolo dell'NGF nel mediare la sopravvivenza e la maturazione dei neuroni in

via di sviluppo nel SNP [42]. Nel SNC, l'NGF maturo ha effetti neuroprotettivi e può influenzare le risposte neurali al danno sui tipi di cellule che mostrano recettori dell'NGF, come i neuroni sensoriali nocicettivi (neuroni simpatici e periferici di piccolo diametro), i motoneuroni α e le cellule di Schwann. L'NGF si lega ai recettori TrkA e p75, recettori espressi nei neuroni sensoriali simpatici/periferici, attivando delle vie di segnalazione che promuovono la differenziazione e la sopravvivenza dei neuroni. È anche noto che l'NGF provoca la rigenerazione delle vie sensoriali nocicettive primarie recise oltre la zona di ingresso della radice dorsale e nel midollo spinale. Tuttavia, gli effetti dell'NGF possono essere sia proinfiammatori che antinfiammatori, attivando i canali del sodio e quelli correlati al mantenimento di stati dolorosi infiammatori; ciò ha portato a limitare l'uso di questa neurotrofina negli studi rigenerativi sulla lesione del midollo spinale.

4.2.2. Fattore neurotrofico derivato dal cervello BDNF

La neurotrofina BDNF è uno dei fattori neurotrofici più studiati e meglio caratterizzati nel SNC. Regola molti processi cellulari coinvolti nello sviluppo e nel mantenimento della normale funzione cerebrale legando e attivando il recettore TrkB. Nel cervello, il BDNF è espresso dai neuroni glutammatergici, dalle cellule gliali, come gli astrociti isolati dalla corteccia e dall'ippocampo, ma non dallo striato, e dalla microglia. Il fattore neurotrofico derivato dal cervello esercita effetti neuroprotettivi e di promozione della crescita su una varietà di popolazioni neuronali dopo la lesione [16]. Ciò è particolarmente evidente nei tratti rubrospinale, reticolospinale e vestibolospinale, nonché sui neuroni propriocettivi del nucleo di Clarke nella sostanza grigia spinale del midollo lombare. Ci sono anche studi che dimostrano che il BDNF riduce la morte cellulare apoptotica inibendo determinate molecole [47]. Per dimostrare l'importante ruolo svolto dal BDNF nella rigenerazione neuronale [48], uno studio ha analizzato il meccanismo di azione del fattore neurotrofico in caso di lesione del nervo sciatico. I risultati hanno mostrato che il BDNF innesca molteplici effetti benefici, tra cui il miglioramento della capacità di crescita intrinseca neuronale e la protezione dell'atrofia della porzione distale per promuovere il recupero comportamentale dopo la lesione. Inoltre, il BDNF ha indotto la sovraregolazione dei geni associati alla crescita come GAP-43 e T-alfa-1-tubulina nei neuroni, contribuendo ad una maggiore rigenerazione.

4.2.3. Neurotrofina-3 NT-3

Il terzo membro della famiglia delle neurotrofine, la neurotrofina-3 (NT-3), è stato scoperto da un gruppo del Max Planck Institute nel 1990. L'NT-3 ha un'attività neurotrofica che si

sovrappone all'NGF, tuttavia, gli studi suggeriscono che ha una specificità più ampia rispetto all'NGF e al BDNF, legandosi a diversi recettori ma con maggior affinità al recettore TrkC. Finora, NT-3 è l'unica neurotrofina isolata che si lega a tale recettore; questo è importante perché i neuroni del tratto corticospinale (CST) esprimono il recettore TrkC. Il CST è il più grande e uno dei più importanti tratti motori che discendono dal cervello. È coinvolto nelle abilità motorie fini come la funzione dettagliata della mano e delle cifre. Gli innesti di cellule ingegnerizzate per esprimere NT-3 nei siti della lesione consentono la crescita del CST su brevi distanze sia in fase acuta che cronica [49]. Una delle più recenti applicazioni [50], inoltre, si concentra sull'uso di NT-3 per superare le neuropatie di Charcot-Marie-Tooth, che sono un gruppo eterogeneo di disturbi dei nervi periferici, dove vengono colpite le cellule di Schwann. Tuttavia, il trattamento continuato con NT-3 non è fattibile a causa della sua breve emivita e della sua assenza dal mercato. Un modo per superare questo problema è il rilascio di NT-3 tramite terapia genica con un virus adeno-associato. Con tale strategia terapeutica, lo studio ha dimostrato che la quantità di NT-3 trovata nel sangue è sufficiente per promuovere significativamente la rigenerazione nervosa.

4.2.4. Fattore neurotrofico derivato dalla linea cellulare gliale GDNF

Identificato per la prima volta come un fattore trofico che promuove la sopravvivenza dei neuroni dopaminergici del mesencefalo durante lo sviluppo embrionale, il GDNF è un altro fattore neurotrofico che ha dimostrato di svolgere un ruolo essenziale nello sviluppo e nel mantenimento del sistema nervoso centrale e periferico. Il legame di GDNF ai suoi recettori innesca diverse vie di segnalazione intracellulare che svolgono un ruolo nel promuovere lo sviluppo, la sopravvivenza e il mantenimento delle interazioni neurone-neurone e neurone-tessuto bersaglio. Gli effetti neuroprotettivi del GDNF possono essere anche utilizzati per sviluppare trattamenti e terapie per migliorare le malattie neurodegenerative. I ricercatori hanno utilizzato cellule staminali mesenchimali umane per fornire GDNF direttamente nel muscolo scheletrico di ratti modello di SLA familiare, mostrando livelli muscolari aumentati di GDNF, trasporto retrogrado della fattore neurotrofico nei motoneuroni ed effetti neuroprotettivi sulla sopravvivenza dei neuroni [51].

4.3. Rilascio di fattori che bloccano gli inibitori della rigenerazione neurale

Una fra le principali problematiche nella rigenerazione neuronale è l'ambiente ostile in cui viene inserito lo scaffold, a causa della presenza di diverse molecole inibitorie. La formazione della cicatrice gliale è uno dei maggiori impedimenti per la ricrescita assonale. Alcune molecole

inibitorie prodotte dalla glia sono CSPG, tenascina o eparina-B2. Per contrastare la resistenza dovuta all'ambiente che si genera post-lesione, diverse strategie sono state adottate sfruttando molecole che contrastano gli inibitori.

La condroitinasi ABC (ChABC), un enzima batterico che digerisce le catene di glicosaminoglicani (GAG) nelle CSPG, facilita la rigenerazione assonale in modelli di lesione neurale. Inoltre, il trattamento locale con ChABC risulta avere effetti sinergici combinato con altre strategie rigenerative, come trapianti di diversi tipi di cellule o biomateriali, fattori neurotrofici, agenti che bloccano gli inibitori della mielina e altri approcci efficaci [10]. D'altra parte, la ChABC presenta alcuni svantaggi: l'elevato tasso di degradabilità e la scarsa stabilità termica, perdendo rapidamente la sua attività enzimatica a 37 °C, rendendo necessario l'uso di iniezioni ripetute o somministrazioni locali per un periodo di giorni o settimane [10, 28]. Per ovviare a questo problema, uno studio ha sfruttato un approccio combinato, dove NT3 e ChABC termicamente stabilizzato utilizzando lo zucchero trealosio, rilasciati da microtubi lipidici inseriti in idrogel, sono stati testati in un modello di SCI, dimostrando un'elevata germinazione assonale e migliore recupero funzionale [28].

Allo stesso modo, la proteina Nogo, un inibitore della crescita assonale derivato dalla mielina, e il suo recettore assonale (Nogo-66) sono stati considerati per promuovere la rigenerazione assonale. Gli anticorpi contro Nogo-66, che è un dominio di 66 residui di Nogo espresso sulla superficie degli oligodendrociti, sono stati coniugati all'idrogel di acido ialuronico (HA) per ottenere un rilascio prolungato dell'anticorpo. È stato anche scoperto che l'incorporazione dell'anticorpo contro il recettore della proteina Nogo nell'idrogel di HA migliora la crescita dei neuroni dell'ippocampo in vitro e promuove il recupero funzionale in un modello animale di ictus [12].

Capitolo 5

Combinazione di biomateriali e trapianto di cellule per la rigenerazione neuronale

5.1. Terapie cellulari

Come precedentemente descritto, la rigenerazione neuronale nel SNP e nel SNC viene limitata da molti fattori e le tecniche terapeutiche tradizionali presentano tutte delle limitazioni o degli effetti collaterali. Negli ultimi anni, sono stati proposti approcci basati sull'ingegneria tissutale e sulla medicina rigenerativa come alternative per la riparazione/rigenerazione assonale, sfruttando la combinazione di biomateriali con il trapianto di cellule. Il trapianto basato su cellule staminali è uno degli approcci più promettenti. La maggior parte delle volte le cellule staminali vengono utilizzate in ragione del loro potenziale di differenziazione; tuttavia, è stato anche dimostrato che sono in grado di fornire un ampio repertorio di molecole di segnalazione, comprese citochine antinfiammatorie e fattori di crescita. Questi ultimi possono modulare l'ambiente inibitorio della lesione mentre aumentano il supporto trofico alle cellule residenti. Finora, cellule staminali di diversa origine sono state testate per la loro capacità di stimolare la rigenerazione nervosa e ripristinare i circuiti neuronali quando vengono rilasciate nel sito danneggiato.

5.2. Cellule staminali embrionali

Tra le popolazioni cellulari proposte per la rigenerazione neuronale vi sono le cellule staminali embrionali (ESC), che sono note per differenziarsi in tutte le linee cellulari fetali, quindi considerate pluripotenti. Tuttavia, le ESC non sono prive di svantaggi: hanno il potenziale per la formazione di teratomi (tumori che derivano dai tessuti embrionali) e sussistono forti limitazioni di ordine etico nell'utilizzo di embrioni umani per l'estrazione delle cellule.

La capacità delle ESC di differenziarsi in cellule neurali e gliali in sistemi di coltura in vitro è stata ampiamente esplorata utilizzando diverse strategie. Ad esempio, in uno dei primi studi i protocolli basati sull'acido retinoico e sul corpo embrioide sono stati utilizzati per indurre la differenziazione neurale delle ESC in coltura [52].

Per quanto riguarda le lesioni nervose periferiche, sono state proposte diverse strategie con ESC. In un modello di lesione del nervo sciatico di ratto [53], è stata testata la capacità delle cellule progenitrici neurali derivate da ESC nel promuovere la riparazione di un nervo periferico gravemente danneggiato. Il trapianto ha portato a una sostanziale ricrescita assonale e alla

riparazione dei nervi. I risultati hanno dimostrato che gli assoni rigenerati erano mielinizzati e mostravano una connessione uniforme tra monconi prossimali e distali, i quali avevano un diametro quasi normale con un fenotipo simile a una SC orientata longitudinalmente e densamente impacchettata. Tuttavia, gli autori evidenziano il fatto che nell'indagine da loro trattata il modello di transezione del nervo sciatico utilizza l'epinevrio rimanente come un'impalcatura naturale, ma in ambito clinico ciò non è detto sia fattibile. Perciò suggeriscono l'utilizzo di condotti di materiali biodegradabili per supportare le cellule trapiantate come efficace sostituto da studiare.

Gli approcci basati su ESC sono stati studiati anche in una serie di modelli di lesioni al midollo. In uno studio [54], le ESC sono state indotte a differenziarsi in cellule progenitrici di oligodendrociti (OPC) di elevata purezza prima del trapianto (questa strategia ovvia al problema della formazione di teratomi) in siti di lesione del midollo spinale (SCI) nei ratti. I risultati rilevano che le OPC trapiantate sono sopravvissute e si sono differenziate in oligodendrociti, garantendo un aumento della rimielinizzazione degli assoni pari al 136%.

5.3. Cellule staminali pluripotenti indotte

Recentemente, un altro tipo di cellule staminali pluripotenti, note come cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC), è emerso come possibile alternativa per ottenere cellule direttamente da tessuti adulti per il trapianto autologo [55, 56]. Le iPSC sono spesso paragonate alle ESC, poiché condividono caratteristiche simili, come la pluripotenza, la capacità di autorinnovamento e l'espressione genica. Inoltre, anche il potenziale di acquisire cariotipi anormali e amplificazione genetica associata alla formazione di teratomi è una caratteristica comune tra i due tipi di cellule. Tuttavia, la differenziazione delle iPSC in linee neurali avviene a una frequenza inferiore rispetto alle ESC.

Il fatto che le iPSC possano essere derivate direttamente da tessuti adulti offre una fonte illimitata di cellule autologhe, che potrebbero essere utilizzate per trapianti senza il rischio di rigetto immunitario. Tuttavia, i problemi di sicurezza come quelli relativi alla formazione del tumore dovrebbero essere determinati prima della loro applicazione clinica. Pertanto, è fondamentale testare attentamente le iPSC per la tumorigenicità.

Diversi studi trattano le applicazioni di queste cellule staminali. NSC derivate da iPSC sono state impiantate due settimane dopo una lesione in ratti immunodeficienti [55], garantendo la crescita di decine di migliaia di assoni per l'intera lunghezza del sistema nervoso centrale del ratto. Questi assoni derivati da iPSC si estendevano attraverso la sostanza bianca adulta del midollo spinale danneggiato, penetrando frequentemente nella materia grigia e formando

sinapsi con i neuroni di ratto. È interessante notare che questo esperimento ha utilizzato cellule di un umano di 86 anni, indicando che l'età non sembra essere un ostacolo all'espressione di cellule staminali neurali altamente plastiche. Un altro studio [56] ha osservato gli effetti benefici delle iPSC-NPC (cellule precursori neurali) sulla conservazione del tessuto ospite, sulla riduzione della cicatrice gliale, sull'aumento della germinazione assonale e sulla promozione del recupero funzionale motorio. Sebbene questi studi attualmente forniscano grandi quantità di prove entusiasmanti per gli effetti terapeutici delle iPSC, alcuni esperimenti hanno anche scoperto che le iPSC-NPC non hanno migliorato o addirittura hanno ridotto il punteggio della funzione neurologica dopo la SCI. Quindi, prima di passare ad applicazioni cliniche, devono ancora essere condotti ulteriori studi preclinici, al fine di indagare il vero potenziale e la sicurezza delle iPSC.

5.4. Cellule staminali neurali

Un'altra popolazione cellulare con un possibile interesse per la ricerca sulla SCI sono le cellule staminali neurali (NSC) multipotenti adulte, che sono particolarmente attraenti per la loro origine nel SNC. È stato dimostrato che queste cellule generano le tre principali linee cellulari neurali del SNC dei mammiferi in coltura.

Il principale meccanismo alla base degli effetti terapeutici delle NSC sulle malattie neurologiche include la modulazione del contributo degli astrociti alla cicatrice gliale, migliorando la differenziazione degli oligodendrociti e la differenziazione neuronale, sostituendo le cellule nervose mancanti nella lesione al midollo e secernendo fattori pro-regenerativi per proteggere i danni alle cellule tissutali. Il trapianto di NSC nel tessuto del midollo spinale danneggiato promuove efficacemente il recupero della funzione corporea. Da un lato, le NSC che entrano nell'area lesa si differenziano in neuroni, che sostituiscono direttamente i neuroni persi o forniscono un substrato neuronale per segnali elettrici per colmare o aggirare l'area della lesione. Gli assoni danneggiati dopo SCI possono formare connessioni con le NSC trapiantate, creando un circuito che potrebbe potenzialmente colmare i tratti interrotti. La crescita assonale nel sito della lesione è significativamente accelerata e la conduzione assonale è moderatamente migliorata dopo il trapianto di NSC. D'altra parte, le NSC secernono un gran numero di fattori di crescita per promuovere la sopravvivenza e la crescita dei neuroni danneggiati. Prima in vitro, e poi in vivo, è stato scoperto che la produzione di fattori di crescita intrinseci da parte delle NSC supporta una crescita estesa degli assoni dell'ospite, che sono noti per essere sensibili a questi fattori [57]. Una caratteristica importante osservata dopo la LM è la demielinizzazione; quindi, promuovendo la differenziazione degli

oligodendrociti, le NSC migliorano la mielinizzazione e la funzione motoria e sensoriale quando trapiantate nel midollo spinale lesionato.

Il lavoro sperimentale di base sulle NSC come terapia cellulare ha mostrato risultati promettenti nella riparazione di cellule e tessuti danneggiati dopo la SCI e alla fine ha portato al tentativo di applicare questa terapia all'uomo. In linea con questo, Stem Cells Inc. Company (Svizzera) ha promosso il primo studio clinico al mondo su persone con lesioni del midollo spinale utilizzando queste cellule [58]. Nel 2011, l'azienda ha avviato uno studio clinico progettato per valutare sia la sicurezza che l'efficacia preliminare di un singolo trapianto di cellule staminali neurali umane fetali purificate (HuCNS-SC), come trattamento per la LM toracica cronica, sia per la LM completa che per quella incompleta. Lo studio ha arruolato sette pazienti con lesioni complete e cinque pazienti con lesioni incomplete. Le cellule sono state iniettate direttamente nel midollo spinale e sono state temporaneamente immunodepresse. Gli aggiornamenti clinici sono stati riportati su un totale di otto dei 12 pazienti arruolati nello studio clinico. Per quanto riguarda i pazienti con lesione completa, è stato riscontrato un significativo guadagno post-trapianto nella funzione sensoriale in quattro pazienti. Per quanto riguarda i soggetti con lesione incompleta, due dei tre pazienti hanno avuto un significativo guadagno nella percezione sensoriale, il terzo è rimasto inalterato.

5.5 Cellule staminali mesenchimali

Negli ultimi anni, anche le cellule staminali mesenchimali (MSC) sono state in prima linea nelle strategie cellulari per la rigenerazione neuronale. Sebbene inizialmente identificate come una popolazione di cellule fibroblastiche multipotenti all'interno del midollo osseo, diversa da una linea ematopoietica, le MSC possono essere ottenute da un'ampia gamma di fonti non midollari. La disponibilità è uno dei vantaggi di queste cellule; infatti, possono essere isolate da tessuto adiposo, sangue periferico, liquido amniotico, cordone ombelicale, tendine e legamenti, follicolo pilifero, membrane sinoviali, mucosa olfattiva, polpa dentale e tessuto fetale.

Le MSC sono di notevole interesse nella rigenerazione dei tessuti dato il loro potenziale di differenziazione, il facile isolamento e l'immunomodulazione. In un ambiente adeguato, la differenziazione delle MSC può essere guidata in linee non mesenchimali, come neuroni, astrociti e cellule simili a Schwann per supportare la rigenerazione dei nervi. Tuttavia, si ritiene che il potenziale delle MSC sia associato alla loro attività trofica; secernono un insieme di molecole bioattive e/o microvescicole (il loro secretoma), che si ritiene medino le attività delle cellule mesenchimali sia paracrine che autocrine. In risposta alla lesione, il secretoma può supportare la riparazione e la rigenerazione dei tessuti danneggiati sopprimendo la risposta

immunitaria locale, migliorando l'angiogenesi e inibendo le cicatrici e l'apoptosi cellulare (Figura 5.1) [59].

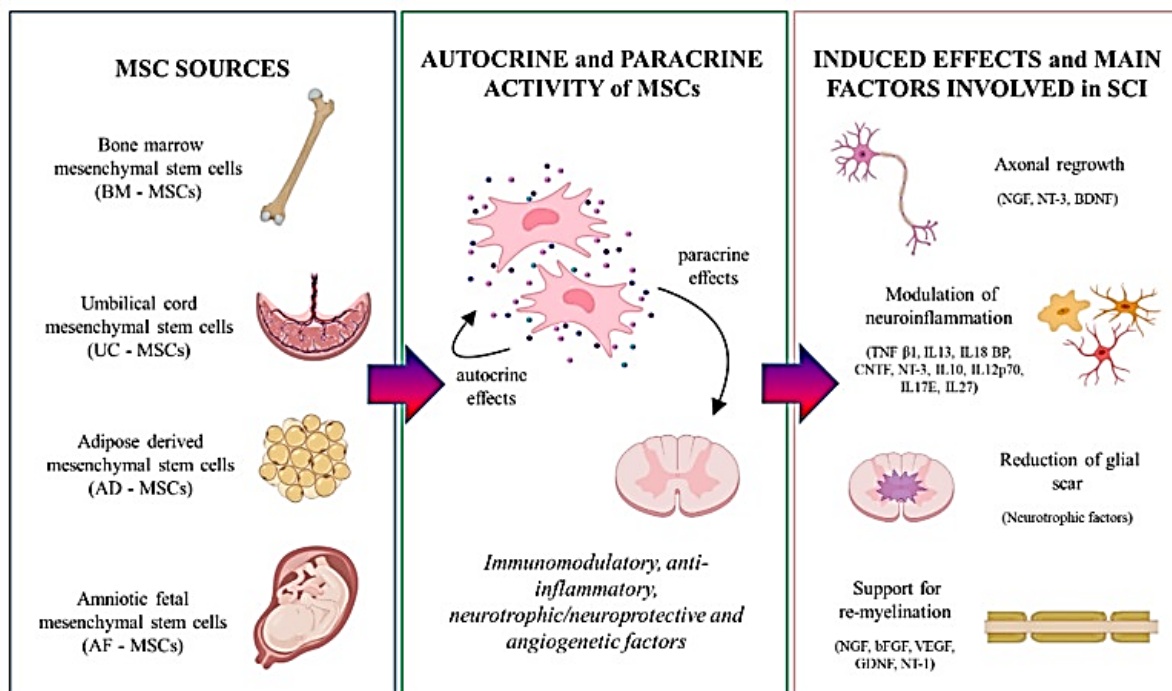


Figura 5.1 Le principali fonti di MSC possono indurre effetti autocrini e paracrini e hanno effetti positivi per la SCI [59].

5.5.1. Cellule staminali derivate dal midollo osseo (BMSC)

Le cellule staminali derivate dal midollo osseo (BMSC) possono differenziarsi in neuroni, astrociti e cellule simili a Schwann in condizioni adeguate. Il destino delle BMSC può essere dettato dal microambiente fisiologico post-trapianto. In un recente studio [60] è stata dimostrata anche l'utilità delle BMSC nella produzione dell'ECM per la realizzazione di innesti per la rigenerazione nervosa. Infatti, lo studio ha evidenziato la capacità delle BMSC di generare una ECM con caratteristiche simili a quella del nervo nativo, sia per quanto riguarda i segnali biochimici che meccanici intrinseci, generando una rigidità più elevata e una struttura più stabile rispetto ad altre ECM generate da SC o fibroblasti. In vitro, la BMSC-ECM ha migliorato significativamente la crescita assonale dei gangli della radice dorsale, mentre test in vivo su un difetto del nervo sciatico da 10 mm, combinando l'ECM con condotti di chitosano e fibroina di seta, hanno permesso la rigenerazione grazie alla combinazione di attributi strutturali specifici, proprietà biomeccaniche favorevoli e il rilascio di segnali molecolari specifici.

È stata studiata anche l'applicazione delle BMSC negli studi clinici, non mostrando attualmente risultati particolarmente promettenti. Infatti, l'impianto autologo di BMSC in una LM acuta e cronica a livello cervicale e toracico in uno studio clinico ha portato al miglioramento significativo per il 90% dei pazienti con lesioni cervicali acute, ma è stato riscontrato solo un lieve miglioramento nei pazienti cronici [61].

Sebbene le BMSC si ottengano più facilmente rispetto alle ESC e alle NSC, la capacità di proliferazione e differenziazione di queste cellule è inferiore a quest'ultime. Inoltre, le BMSC sono limitate dalla necessità di una procedura invasiva per il prelievo autologo. Le procedure di approvvigionamento sono invasive e dolorose e di solito necessitano di anestesia, mentre la frazione di cellule staminali ottenuta è ovviamente inferiore rispetto ad altre fonti.

5.5.2. Cellule staminali derivate dal tessuto adiposo (ADSC)

Le ADSC isolate dal tessuto adiposo sono tra le cellule staminali più utilizzate e possono essere derivate tramite procedure comuni come la liposuzione. Queste cellule sono particolarmente vantaggiose poiché sono disponibili tramite raccolta minimamente invasiva con un'elevata resa cellulare. Inoltre, mostrano una proporzione più elevata e un potenziale di proliferazione e differenziazione superiore rispetto alle BMSC. Le ADSC possono essere differenziate in un fenotipo simile a SC (cellule staminali di derivazione adiposa differenziata, dASC) che condivide proprietà morfologiche e funzionali con quest'ultime, rappresentando così una valida alternativa. Molti studi in vitro e in vivo hanno confermato la capacità delle ADSC di promuovere la rigenerazione dei nervi, sia in condizioni indifferenziate [62] che differenziate [63]. Per quanto riguarda le ADSC indifferenziate, sono state sollevate alcune preoccupazioni riguardanti la possibile differenziazione che le cellule possono subire quando impiantate, dando origine a fenotipi non desiderabili, la limitata capacità rigenerativa e la possibilità di raggiungere organi lontani. Invece, è stato dimostrato che le ADSC si differenziano in cellule simil-Schwann e inoltre, secernono esosomi (vescicole, componenti del secretoma delle cellule), contenenti messaggeri, come la proteina Gap43 e la proteina Tau, e microRNA noti per svolgere un ruolo importante nella rigenerazione dei nervi; tuttavia, il processo di differenziazione può richiedere più di 2,5 settimane, prolungando la denervazione del nervo ferito e peggiorando il recupero funzionale.

5.5.3. Cellule staminali del cordone ombelicale umano (HUCMSC)

Anche le cellule staminali mesenchimali del cordone ombelicale umano (HUCMSC) stanno diventando molto popolari nell'ingegneria tissutale e più specificamente a fini della

rigenerazione dei nervi periferici. Queste cellule mostrano caratteristiche eccezionali come il potenziale di differenziazione multilineare (cioè la capacità di differenziarsi in cellule di diverso tipo), l'attitudine immunomodulatoria e la rapida proliferazione. Inoltre, diversi fattori neurotrofici correlati all'aumento della rigenerazione nervosa sono secreti dalle HUCMSC. Questi fattori stimolano la sopravvivenza neuronale, la vascolarizzazione, la sovraregolazione delle integrine, il rilascio di molecole antinfiammatorie e l'aumento della sopravvivenza e della proliferazione delle cellule di Schwann. Pertanto, gli effetti paracrini delle HUCMSC probabilmente rappresentano l'efficacia delle cellule nel trattamento delle lesioni nervose [64].

5.6. Cellule gliali

Il possibile ruolo di altre cellule mature sul processo rigenerativo neuronale ha attirato l'attenzione dei ricercatori. A tale scopo, nell'ultimo decennio sono state esplorate le cellule gliali, comprese le cellule olfattive di rivestimento (OEC) e le cellule di Schwann (SC).

5.6.1. Cellule di rivestimento olfattivo

Le cellule di rivestimento olfattivo (OEC) sono cellule gliali che avvolgono gli assoni olfattivi, all'interno di entrambe le porzioni del SNP e del SNC della via olfattiva primaria, e sono responsabili della rigenerazione degli assoni olfattivi per tutta la vita dei mammiferi adulti. Queste cellule hanno un fenotipo altamente malleabile, molto probabilmente dovuto alle caratteristiche fenotipiche che esprimono astrociti e SC. Secondo questa ipotesi, si ritiene che possano passare da un tipo all'altro a seconda delle loro esigenze, o combinare i ruoli di entrambi quando trapiantate in una lesione.

Lo studio iniziale che ha ispirato il trapianto di OEC prevedeva l'innesto di queste cellule nella zona di ingresso della radice dorsale del SNC post-sviluppo [65]. Le cellule innestate sono state in grado di promuovere la ricrescita delle radici dorsali sezionate, il che è stato interessante poiché questa è una regione in cui normalmente non si verifica la rigenerazione delle radici dorsali secondo chi ha svolto lo studio. Dopo questi risultati, numerosi studi hanno dimostrato l'efficacia delle OEC nel supportare la crescita e la rimielinizzazione degli assoni del SNC non olfattivi. In uno studio del 2020 [66], i ricercatori hanno isolato, coltivato e purificato delle OEC ricavate dalla mucosa olfattiva e dal bulbo olfattivo e sono state trapiantate in un condotto PLA/chitosano per colmare il nervo facciale difettoso nel ratto. Dopo diverse valutazioni, i risultati erano piuttosto simili: gli OEC potrebbero promuovere la rigenerazione del nervo facciale danneggiato. In particolar modo, secondo gli autori, gli OEC derivati dalla mucosa

sono risultati più efficaci nel promuovere la rigenerazione dei nervi e questo è stato evidenziato significativamente dopo otto settimane dal trapianto.

Per quanto riguarda il trapianto di OEC nelle lesioni umane, sono già stati eseguiti alcuni studi clinici. La fattibilità e la sicurezza del trapianto autologo di OEC in pazienti con lesioni toraciche complete è stata testata in uno studio clinico [67], senza complicanze per quanto riguarda la sicurezza della procedura. Non sono state riportate cisti nel midollo spinale o formazione di tumori, né dolore neuropatico né deterioramento dello stato neurologico. Inoltre, non ci sono stati cambiamenti funzionali significativi in nessun paziente. Al contrario, uno studio clinico ha mostrato che l'autotrapianto di mucosa olfattiva in pazienti con LM cronica grave aveva promosso miglioramenti motori in 11 pazienti (su 20) [68]. Sebbene alcuni eventi avversi siano stati riportati in cinque dei pazienti, è stata osservata la crescita di tessuto non neoplastico nel sito della lesione di tutti loro.

Sebbene il trapianto OEC sia avanzato in prima linea nell'innovazione terapeutica per la riparazione del midollo spinale nel corso degli anni, gli studi hanno riportato risultati variabili dovuti a una serie di ragioni, una delle quali riguarda la purezza cellulare, cioè la proporzione di OEC all'interno di una preparazione di colture cellulari prima del trapianto. Per questo prima di giungere ad una piena sicurezza nell'uso degli OEC in studi clinici andrebbe sviluppato un metodo di identificazione e purificazione standardizzato [69].

5.6.2. Cellule di Schwann

Le cellule di Schwann svolgono un ruolo fondamentale nella degenerazione walleriana. L'alto numero di SC dopo una lesione dimostra che vengono attivate e la loro presenza è benefica. Pertanto, molte terapie si basano sul trapianto di queste cellule autologhe o allogeniche per consentire agli assoni del sistema nervoso danneggiati di ricrescere e rimielinizzare. Inoltre, un altro fatto interessante riguarda le SC geneticamente modificate, le quali sovraesprimono NGF o BDNF, aumentando notevolmente la crescita assonale e la rimielinizzazione dopo il trapianto. In uno studio [70], SC ingegnerizzate di ratto neonatale per favorire il rilascio di farmaci sono state inserite in un idrogel (principalmente costituito da acido ialuronico e laminina) che fungeva da riempitivo per un condotto di chitosano per la ricostruzione di un difetto di 15 mm di lunghezza critica nel modello del nervo sciatico di ratto. Secondo gli autori, i risultati hanno confermato che il trapianto di SC all'interno dei condotti nervosi è vantaggioso e la loro modificazione genetica nei sistemi di rilascio dei fattori neurotrofici ha dimostrato di supportare il recupero assonale e funzionale.

Indipendentemente dai progressi nella terapia cellulare per il trattamento delle lesioni neuronali che si rivelano promettenti, questo approccio non riesce a produrre un recupero funzionale adeguato. Quando le cellule vengono semplicemente rilasciate direttamente nel sito della lesione, una percentuale elevata può non sopravvivere all'ambiente sfavorevole causato dalla lesione e inoltre, la rigenerazione dei nervi necessita di una guida strutturale e un ambiente adeguato alla crescita. Pertanto, sono necessarie alternative per fornire in modo efficiente cellule e terapie cellulari all'interno dei siti.

5.7. Strategie combinate di scaffold e trapianto cellulare

Nonostante il lavoro di base sperimentale riguardante il trapianto di cellule e la realizzazione di scaffold con biomateriali, il loro uso come approcci singoli presenta alcune limitazioni. Per quanto riguarda i soli biomateriali, non è sempre facile modulare le loro proprietà in modo che rispondano esattamente come previsto e non sono in grado di sostituire le cellule perse durante la lesione. D'altra parte, il trapianto di cellule da solo non è in grado di ricreare l'architettura e la stabilità complessa del tessuto nativo, e nemmeno guidare la ricrescita assonale diretta. Quindi, sfruttando ciò che entrambe le terapie offrono, possono essere forniti effetti sinergici sulla rigenerazione e sul recupero funzionale dell'area danneggiata impiegando strategie combinate (Figura 5.2).

I ricercatori si sono concentrati sull'uso di biomateriali, in particolare idrogel, come sistemi per l'incapsulamento e il rilascio delle cellule nel midollo spinale danneggiato. I vantaggi di questi approcci combinatori sono stati rivelati in diversi studi.

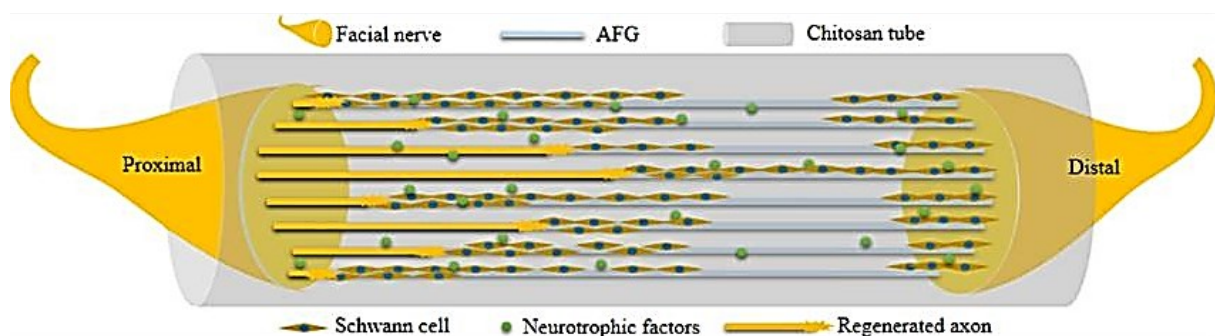


Figura 5.2 Illustrazione del processo di rigenerazione assonale combinando la terapia cellulare ed uno scaffold di chitosano [20].

Per quanto riguarda le NSC, il loro comportamento è legato alle caratteristiche meccaniche dello scaffold, poiché il tasso di differenziazione risulta essere più elevato nelle nanofibre rispetto alle microfibre, indipendentemente dall'allineamento. Inoltre, si sono dimostrati molto

promettenti come vettori cellulari gli scaffold di PLA, acido(poli glicolico) sintetico (PGA) e i loro copolimeri, associati a biomateriali naturali. È stato realizzato un condotto nervoso laminina-chitosano-PLGA seminato con NSC e SC per valutare la rigenerazione dei nervi laringei feriti nei ratti [71]. Il condotto era costituito da 10 filamenti di nanofibre e presentava un diametro interno di 0,6 mm, uno spessore della parete del tubo di 0,2 mm e una lunghezza di 2 cm. I risultati, dopo diverse analisi, hanno dimostrato che i filamenti di nanofibre incorporati hanno sostenuto il condotto, il quale ha esibito una certa resistenza alla compressione ed elasticità. Il condotto ha permesso la vascolarizzazione e non si è verificata atrofia muscolare o gonfiori e cicatrici evidenti sulla connessione nervosa. Gli assoni si sono rigenerati con successo con una struttura ordinata e una spessa guaina mielinica. Infine, secondo gli autori, l'associazione di SC e NSC si è rivelata una scelta ottimale poiché grazie al rilascio di fattori neurotrofici da parte delle SC, si è evitata la morte delle cellule staminali neurali, garantendo la differenziazione in neuroni. Tuttavia, secondo gli autori, prima di raggiungere un'applicazione clinica è necessario sviluppare dei procedimenti standard uniformi per garantire la rigenerazione. Tenendo conto della ben nota capacità degli OEC di supportare e guidare l'allungamento assonale e anche dei loro interessanti risultati quando trapiantati in modelli di lesione neuronale, anche la loro combinazione con una matrice 3D è molto promettente. Tra i vari studi che esplorano la combinazione di biomateriali e OEC, sono stati sviluppati modelli in vitro per testare la biocompatibilità degli OEC con diversi idrogel [72]. Dallo studio è emerso che negli idrogel di alginato, gli OEC presentano una forma sferica atipica e la loro attività metabolica è inibita. Tuttavia, quando l'alginato è integrato con la fibronectina, le OEC sono risultate le uniche cellule in grado di proliferare. Invece, se coltivati in Matrigel, la loro proliferazione viene stimolata e la loro tipica morfologia è preservata. Passando agli esperimenti in vivo [73], è stato valutato il recupero locomotorio dei ratti SCI quando trattati con un'impalcatura di albumina derivata dal siero seminata con OEC. In primo luogo, è stato dimostrato che OEC aderivano allo scaffold, rimanevano vitali ed esprimevano marcatori specifici, migliorando le capacità locomotorie in diversi momenti. Inoltre, c'è stata una riduzione della formazione di cicatrici gliali ed è stata osservata la presenza di cellule che esprimono marcatori di neuroni e assoni nel sito della lesione.

La combinazione di MSC con biomateriali è emersa anche come un potenziale approccio di ingegneria tissutale, con l'obiettivo di aumentare sia l'efficienza di adesione delle MSC che la sopravvivenza nel sito della lesione. Ad esempio [74], uno studio ha valutato l'uso di BMSC incorporate in uno scaffold poroso di chitosano-collagene (porosità del 90%) in un modello di ratto TBI per testare la biocompatibilità, l'immunogenicità e la loro capacità di promuovere la

rigenerazione dei neuroni e di migliorare i risultati funzionali. Quando è stata trapiantata nel cervello, l'impalcatura ha fornito una microstruttura praticabile per la proliferazione e la differenziazione del BMSC (Figura 5.3). Le BMSC sono sopravvissute e si sono differenziate in neuroni o cellule gliali, anche se lo scaffold collagene-chitosano si è parzialmente degradato nella zona del trapianto. I risultati hanno portato al recupero delle funzioni neurologiche, comportamentali e cognitive, tuttavia gli autori sottolineano il fatto che lo studio è stato svolto sui topi e sono pertanto necessarie ulteriori conferme per applicarlo all'uomo.

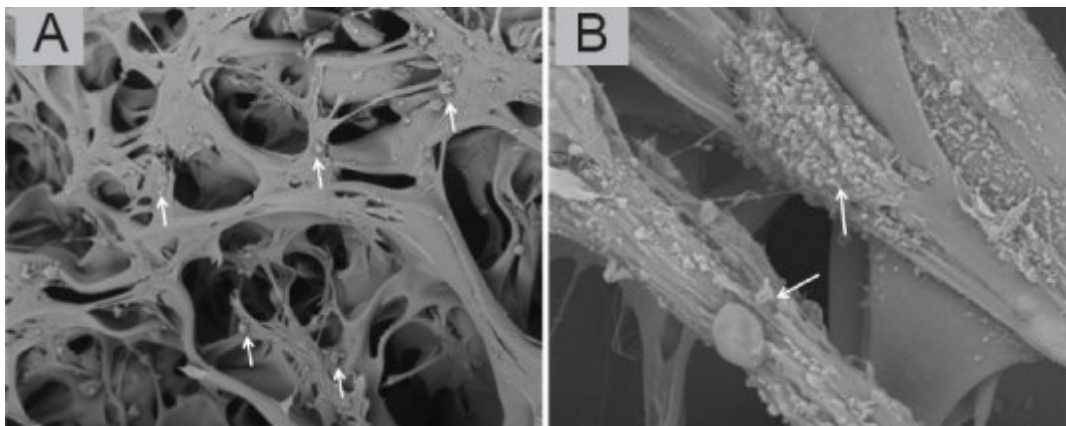


Figura 5.3 Immagini al microscopio elettronico a scansione di matrice porosa di collagene-chitosano impregnata di cellule staminali mesenchimali del midollo osseo (indicate con le frecce) dopo co-cultura per 48 ore [73].

In un altro studio [75], uno scaffold composto da un biopolimero di fibrina eterologo (HFB), il quale non è citotossico ed è biodegradabile con proprietà adesive e sigillanti, è stato utilizzato per trattenere le MSC derivate dal tessuto adiposo nella parete interna di un condotto di guida nervosa PCL per la rigenerazione di un gap da 12 mm nel ratto. I risultati hanno dimostrato che le ADSC hanno espresso in maniera continuativa i fattori di crescita BDNF e GDNF, influenzando in maniera significativa la sopravvivenza neuronale, la proliferazione delle cellule di Schwann e la rigenerazione assonale. Il NGC stampato in 3D è stato progettato secondo parametri controllati per mantenere la diffusione dei nutrienti come la porosità (dimensioni di 125–550 μm) e lo spessore della parete (dimensione di 600 μm) senza influire sulle proprietà meccaniche; il diametro interno è stato adattato alle dimensioni del nervo (< 2 mm) per evitare la compressione e supportare la diffusione. Inoltre, la struttura è stata progettata in base alla dimensione della lesione (lunghezza di 1,5 cm) adatta a colmare il gap libero dalla tensione. In conclusione, lo studio ha mostrato che il costruito ha garantito un recupero locomotorio funzionale ed elettrofisiologico positivo dopo 8 e 12 settimane a seguito di lesioni sperimentali critiche. Inoltre, è passato a un profilo pro-rigenerativo mediato da fattori neurotrofici durante

le prime quattro settimane nel microambiente dei nervi e del midollo spinale, migliorando così il recupero funzionale.

Per quanto riguarda le applicazioni in campo clinico [76], due pazienti con LM acuta completa sono stati sottoposti ad un trapianto di scaffold NeuroRegen (scaffold di collagene ordinato lineare) caricati con MSC del cordone ombelicale umano. Dopo l'intervento chirurgico nei due pazienti non sono stati osservati sintomi avversi evidenti come infezioni, reazioni allergiche, febbre alta o complicanze perioperatorie correlate all'impianto degli scaffold funzionali. A partire dal secondo mese dall'intervento, i pazienti hanno iniziato a recuperare la funzione sensoriale, mentre dal terzo mese è stato verificato il primo recupero motorio. Dopo 6 mesi, i pazienti hanno iniziato a camminare con l'aiuto del tutore. I risultati ottenuti hanno per la prima volta dimostrato che l'impianto di scaffold di collagene funzionalizzato con MSC potrebbe servire come trattamento efficace per i pazienti con LM acuta completa.

I risultati esposti sono molto promettenti per quanto riguarda l'uso dei biomateriali come vettori cellulari per la rigenerazione neuronale; tuttavia, gli studi clinici risultano essere ancora poco diffusi. In futuro, la sfida sarà definire il biomateriale più promettente per progettare terapie cellulari efficaci e trovare una tecnica standard sicura per le applicazioni in campo clinico.

4.8. Accostamento con la terapia genica

La terapia genica può essere definita come il trattamento di un disturbo mediante l'introduzione di materiale genetico nei bersagli cellulari appropriati. Inizialmente, veniva utilizzata per correggere le mutazioni genetiche associate a malattie ereditarie. Tuttavia, oggi la terapia genica può essere applicata anche nella riprogrammazione delle cellule in contesti diversi, uno dei quali è la lesione neuronale.

Il trasferimento genico ai nervi periferici e alle cellule di Schwann è stato realizzato attraverso vari vettori virali [77]. Come descritto nei capitoli precedenti, le SC svolgono un ruolo centrale nella rigenerazione dei nervi periferici in quanto sono responsabili della secrezione di molecole che promuovono la crescita, guidando gli assoni rigeneranti verso gli organi bersaglio e inoltre si occupano della rimielinizzazione. Tuttavia, le proprietà pro-rigenerative di queste cellule possono svanire dopo lunghi periodi di denervazione. Il rilascio genico alle SC viene sfruttato per il mantenimento di tali proprietà per un periodo più lungo. Ciò rende la terapia genica un potenziale trattamento coadiuvante nella ricostruzione dei nervi a seguito di lesioni.

L'uso delle cellule staminali nel contesto della rigenerazione neuronale può essere potenziato sottoponendole a modificazione genetica *ex vivo* prima della semina su scaffold per il trapianto. Ciò comporta l'ottenimento di cellule da pazienti o donatori seguita da manipolazione *in vitro*

per aumentare il potenziale terapeutico della cellula e successivo trapianto nel paziente. Questo approccio presenta numerosi vantaggi rispetto alla terapia genica. Il rilascio di materiale genetico può essere mirato a un tipo di cellula specifico, cioè la cellula terapeutica, senza influenzare altre cellule del corpo. Le cellule possono essere caratterizzate in vitro per l'incorporazione di successo del transgene e solo quelle che mostrano attività biologica vengono quindi incorporate nei dispositivi di riparazione dei nervi.

4.8.1. Sistemi di rilascio genico

Le cellule eucariotiche presentano una serie di barriere che impediscono al materiale genetico esogeno di entrare nel loro genoma. Questo è problematico per la terapia genica, che è fortemente dipendente dalla inclusione efficace dei geni nelle cellule. Pertanto, sono stati progettati sistemi di consegna genica per facilitare questo processo, con i vettori virali che emergono come l'approccio migliore [77].

I vettori virali sono associati ad un alto tasso di trasduzione delle cellule bersaglio e di espressione del transgene e recenti sviluppi hanno portato a buoni profili di sicurezza. Infatti, circa il 70% degli studi clinici di terapia genica per varie condizioni condotti finora ha utilizzato virus per fornire geni [78]. Il successo è dovuto al fatto che i virus hanno avuto milioni di anni di evoluzione per sviluppare meccanismi altamente efficienti attraverso i quali entrare nelle cellule e consegnare il loro carico genetico. I vettori virali sono stati geneticamente modificati per rimuovere i componenti patogeni e la loro capacità di autoreplicarsi, mantenendo i loro meccanismi efficienti per l'ingresso nelle cellule e la consegna del gene terapeutico inserito. Le caratteristiche ideali includono la capacità di essere ottenuti in modo riproducibile, stabile e con livelli di purificazione elevati, per mediare il rilascio mirato e l'espressione del transgene senza indurre effetti collaterali dannosi. Diversi vettori virali sono stati sviluppati per adattarsi ad ogni possibile applicazione: adenovirus, virus adeno-associato (AAV) e lentivirus.

I vettori lentivirali possono essere considerati l'attuale gold standard nella terapia genica sperimentale per la riparazione dei nervi. Ciò può essere attribuito a diversi fattori. Le cellule di Schwann si dividono rapidamente nel contesto della lesione ai nervi periferici. I lentivirus offrono un'espressione stabile nelle cellule in divisione e possono quindi potenzialmente garantire una fornitura continua di fattori neurotrofici, mantenendo così l'ambiente pro-rigenerativo necessario per la rigenerazione dei nervi periferici. Questo perché hanno la capacità di integrare il transgene nel genoma della cellula ospite, così quando le cellule si dividono, tutta la progenie porta anche una copia del gene terapeutico. Inoltre, la scelta del vettore virale giusto per il tipo della cellula bersaglio è essenziale per garantire l'efficienza della

trasduzione. Gli AAV differiscono notevolmente nella loro capacità di colpire vari tessuti e tipi di cellule ed è necessaria un'attenta selezione del sierotipo per il successo della trasduzione. D'altra parte, la gamma di cellule ospiti dei vettori lentivirali può essere ampliata o alterata modificando l'involucro virale.

In conclusione, sebbene siano necessari ulteriori studi e approfondimenti, la nuova strategia sperimentale di combinazione di terapia genica e cellulare nel contesto della rigenerazione neuronale può fornire l'ambiente ottimale per la rigenerazione assonale e il ripristino dei circuiti funzionali, portando a risultati ottimali per il paziente.

Capitolo 6

Conclusioni

A causa della sua complessa struttura anatomica, la riparazione del sistema nervoso è una delle grandi sfide della medicina moderna. Tuttavia, sono stati compiuti progressi significativi nella rigenerazione neuronale sfruttando nuovi biomateriali, le nanotecnologie e le terapie cellulari. Il raggiungimento della rigenerazione e della riconnessione assonale attraverso la lesione è l'obiettivo principale da ottenere. L'uso del trapianto di cellule è una delle strategie più promettenti per questo tipo di trattamento. La loro traduzione in applicazioni cliniche per l'uomo è attualmente in corso, suscitando questioni relative alla biosicurezza e alla biocompatibilità. Tuttavia, l'efficacia della terapia cellulare è ancora compromessa dalle innumerevoli barriere riscontrate, inclusa la significativa morte cellulare osservata, che diminuisce chiaramente l'efficacia di questa tecnica. Inoltre, il trapianto di cellule non è sufficiente per promuovere il rimodellamento dei tessuti e la rigenerazione assonale attraverso la densa cicatrice gliale.

L'ingegneria tessutale si occupa di fornire una soluzione a questo problema. L'ingegneria tessutale è basata sulla combinazione di biomateriali, cellule e molecole bioattive per imitare l'ambiente biologico e supportare la riparazione dei tessuti. Tuttavia, l'evoluzione di sofisticati scaffold 3D o 2D per tale microambiente non è esente da sfide. Dalle esigenze come la disponibilità di ossigeno e la diffusione dei nutrienti per le cellule incapsulate, alla ricerca dell'adeguata porosità/permeabilità, alle caratteristiche biomeccaniche migliori e al rilascio dei fattori di crescita necessari, sono molti gli aspetti che devono essere considerati per la coltura di cellule, poiché è già accertato che la sopravvivenza e la differenziazione cellulare e l'omeostasi dei tessuti dipendono fortemente da queste condizioni.

Tuttavia, con la crescente conoscenza dei meccanismi con cui i biomateriali specificamente progettati supportano il comportamento cellulare, e quindi di come viene promossa la rigenerazione nel sistema nervoso, il futuro della rigenerazione neuronale è probabilmente legato ad approcci combinatori. Nel frattempo, devono essere affrontati studi avanzati su come i biomateriali modulano l'attività cellulare e sulla biosicurezza ed efficacia di questa terapia, in vista della sua applicazione clinica.

Capitolo 7

Abbreviazioni

AAV	Virus adeno-associato
ADSC	Cellule staminali derivate dal tessuto adiposo
BBB	Barriera emato-encefalica
BDNF	Fattore neurotrofico derivato dal cervello
BMSC	Cellule staminali derivate dal midollo osseo
chABC	Condroitinasi ABC
CNT	Nanotubi di carbonio
CSPG	Proteoglicani condroitin solfato
CST	Tratto corticospinale
ECM	Matrice extracellulare
ESC	Cellule staminali embrionali
GDNF	Fattore neurotrofico derivato dalla linea cellulare gliale
HA	Acido Ialuronico
HUCMSC	Cellule staminali del cordone ombelicale umano
iPSC	Cellule staminali pluripotenti indotte
LM	Lesione del midollo spinale
MSC	Cellule staminali mesenchimali
NGC	Condotto di guida nervosa
NGF	Fattore di crescita neurale
NP	Nanoparticelle
NSC	Cellule staminali neurali
NT-3	Neurotrofina-3
OEC	Cellule di rivestimento olfattivo
PCL	Policaprolattone
PEG	Glicole polietilenico
PGA	Acido poli-glicolico
PHEMA	Poli(2-idrossietilmetacrilato)
PHPMA	Poli[N-2-(idrossipropil)metacrilammide]
PLA	Acido poli-lattico
PLGA	Acido poli-lattico-co-glicolico
PNI	Lesione dei nervi periferici
PVA	Alcool polivinilico
SAP	Peptidi auto-assemblanti
SC	Cellule di Schwann
SCI	Spinal Cord Injury
SLA	Sclerosi Laterale Amiotrofica
SNC	Sistema nervoso centrale
SNP	Sistema nervoso periferico
TBI	Trauma cranico
VEGF	Fattore di crescita endoteliale vascolare

Bibliografia

- [1] “Biomaterials for Neural Tissue Engineering,” Laura R.D., Cristina M.R. and Manuel M.P., *Front. Nanotechnol.* (2021)
- [2] “Human physiology: an integrated approach,” Silverthorn D., Pearson Ed. (2016); 7
- [3] “Peripheral Nerve Reconstruction after Injury: A Review of Clinical and Experimental Therapies,” D. Grinsell and C.P. Keating, *BioMed Res. Int.* (2014); 698256.
- [4] National Spinal Cord Injury Statistical Center, Facts and Figures at a Glance. Birmingham, AL: University of Alabama at Birmingham, 2020.
- [5] “Traumatic Brain Injury-related Hospitalizations and Deaths by Age Group, Sex, and Mechanism of Injury” from the Division of Injury Prevention (DIP), National Center for Injury Prevention and Control (NCIPC), Centers for Disease Control and Prevention (CDC), U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, Georgia.
- [6] “Acute Management of Traumatic Brain Injury,” Michael A.V., Marie C: and Mayur B.P., *Surg Clin North Am.* (2017); 97(5): 1015–1030.
- [7] “Heart disease and stroke statistics,” Virani S.S., Alonso A., Benjamin E.J., Bittencourt M.S., Callaway C.W., Carson A.P., et al. American Heart Association external icon. *Circulation.* (2020); 141 (9): 139–596.
- [8] “Biomaterials in Neurodegenerative Disorders: A Promising Therapeutic Approach,” M. Bordoni, E. Scarian, F. Rey, S. Gagliardi, S. Carelli, O. Pansarasa and C. Cereda, *Int J Mol Sci.* (2020); 21(9): 3243.
- [9] “Modern Trends for Peripheral Nerve Repair and Regeneration: Beyond the Hollow Nerve Guidance Conduit,” C.R. Carvalho, J.M. Oliveira and R.L. Reis, *Front Bioeng Biotechnol.* (2019); 7: 337.
- [10] “Scar-mediated inhibition and CSPG receptors in the CNS,” K. Sharma, M.E. Selzer, and S. Li, *Exp Neurol.* (2012); 237(2): 370–378.
- [11] “Dissecting the Dual Role of the Glial Scar and Scar-Forming Astrocytes in Spinal Cord Injury,” Tuo Y., YuJuan D., Gang C. and ShuSen C., *Front Cell Neurosci.* (2020); 14: 78
- [12] “Hydrogel systems and their role in neural tissue engineering,” Pallavi M., Gayathri R. and Sahadev S., *J. R. Soc. Interface.* (2020); 17
- [13] “In situ gelling hydrogels for conformal repair of spinal cord defects, and local delivery of BDNF after spinal cord injury,” A. Jain, Y.T. Kim, R.J. McKeon and R.V. Bellamkonda, *Biomaterials.* (2006); 27 (3): 497–504.

- [14] “Sustained delivery of activated rho GTPases and BDNF promotes axon growth in CSPG-rich regions following spinal cord injury,” A. Jain, R.J. McKeon, S.M. Brady-Kalnay and R.V. Bellamkonda, PLoS ONE. (2011); 6 (1): e16135.
- [15] “Sustained delivery of thermostabilized chABC enhances axonal sprouting and functional recovery after spinal cord injury,” H. Lee, R.J. McKeon and R.V. Bellamkonda, Proc Natl Acad Sci U S A. (2010); 107(8): 3340–3345.
- [16] “Templated agarose scaffolds for the support of motor axon regeneration into sites of complete spinal cord transection,” M. Gao, P. Lu and B. Bednark, Biomaterials. (2013); 34(5): 1529–1536.
- [17] “Peripheral nerve regeneration through alginate gel: analysis of early outgrowth and late increase in diameter of regenerating axons,” Hashimoto T., Suzuki Y., Kitada M., Kataoka K., Wu S., Suzuki K., Endo K., Nishimura Y. and Ide C. Exp Brain Research. (2002); 146: 356–368.
- [18] “Stabilization, Rolling, and Addition of Other Extracellular Matrix Proteins to Collagen Hydrogels Improve Regeneration in Chitosan Guides for Long Peripheral Nerve Gaps in Rats,” Gonzalez-Perez F., Cobiañchi S., Heimann C., Philips J.B., Udina E. and Navarro X., Neurosurgery. (2017); 80:465–474.
- [19] “Fibrinogen triggers astrocyte scar formation by promoting the availability of active TGF- β after vascular damage,” C. Schachtrup, J. K. Ryu and M. J. Helmrick, The Journal of Neuroscience. (2010); 30 (17): 5843–5854.
- [20] “Chitosan Tubes Prefilled with Aligned Fibrin Nanofiber Hydrogel Enhance Facial Nerve Regeneration in Rabbits,” X. Mu, X. Sun, S. Yang, S. Pan, J. Sun, Y. Niu, ACS Omega. (2021); 6 (40): 26293–26301.
- [21] “Chitosan/gelatin porous scaffolds assembled with conductive poly(3,4-ethylenedioxythiophene) nanoparticles for neural tissue engineering,” Wang S., Sun C., Guan S., Li W., Xu J., Ge D., Zhuang M., Liu T. and Ma X., Journal of Mater Chem B. (2017); 5: 4774–4788.
- [22] “Human hair keratins promote the regeneration of peripheral nerves in a rat sciatic nerve crush model,” J. Gao, L. Zhang, Y. Wei, T. Chen, X. Ji, K. Ye, J. Yu, B. Tang, X. Sun, and J. Hu. J Mater Sci Mater Med. (2019); 30(7): 82.
- [23] “Spinal cord repair with PHPMA hydrogel containing RGD peptides (NeuroGel™),” S. Woerly, E. Pineta, L. de Robertisa, D. Van Diepa, and M. Bousminab. Biomaterials. (2001); 22 (10): 1095-1111.

- [24] “The Effect of iPS-Derived Neural Progenitors Seeded on Laminin-Coated pHEMA-MOETACl Hydrogel with Dual Porosity in a Rat Model of Chronic Spinal Cord Injury,” J. Ruzicka, N. Romanyuk, K. Jirakova, A. Hejcl, O. Janouskova, L.U. Machova, M. Bochin, M. Pradny, L. Vargova, and P. Jendelova. *Cell Transplant.* (2019); 28 (4): 400–412.
- [25] “Intravenous Polyethylene Glycol Inhibits the Loss of Cerebral Cells after Brain Injury,” Koob A.O., Duerstock B.S., Babbs C.F., Sun Y.I. and Borgens R.B., *J Neurotrauma.* (2005); 22: 1092–1111.
- [26] “Tissue-Engineered Regeneration of Completely Transected Spinal Cord Using Induced Neural Stem Cells and Gelatin-Electrospun Poly (Lactide-Co-Glycolide)/Polyethylene Glycol Scaffolds,” Liu C., Huang Y., Pang M., Yang Y., Li S., Liu L., Shu T., Zhou W., Wang X., Rong L. and Liu B., *PLoS ONE.* (2015); 10.
- [27] “Chitosan Functionalized Magnetic Nanoparticles to Provide Neural Regeneration and Recovery after Experimental Model Induced Peripheral Nerve Injury,” N.L. Pop, A. Nan, A. E. Urda-Cimpean, A. Florea, V.A. Toma, R. Moldovan, N. Decea, D.R. Mitrea, and R. Orasan. *Biomolecules.* (2021); 11 (5): 676.
- [28] “Interaction of iPSC-derived neural stem cells on poly(L-lactic acid) nanofibrous scaffolds for possible use in neural tissue engineering,” Chengkai L., Chang L. and Liangming Z., *Int J Mol Med.* (2018); 41(2): 697–708.
- [29] “Electrospun PVA. Keratin Nanofibrous Scaffold and its Application in Neural Repair,” Mahanta B., Mary S.A., Bhaduri A. and Giridev V.R., *Trends Biomater Artif Organs.* (2014); 28: 188–196.
- [30] “Aligned chitosan nanofiber hydrogel grafted with peptides mimicking bioactive brain-derived neurotrophic factor and vascular endothelial growth factor repair long-distance sciatic nerve defects in rats,” F. Rao, Y. Wang, D. Zhang, C. Lu, Z. Cao, J. Sui, M. Wu, Y. Zhang, W. Pi, B. Wang, Y. Kou, X. Wang, P. Zhang, and B. Jiang. *Theranostics.* (2020); 10 (4): 1590–1603.
- [31] “A novel polycaprolactone/carbon nanofiber composite as a conductive neural guidance channel: an in vitro and in vivo study,” S. Farzamfar, M. Salehi, S.M. Tavangar, J. Verdi, K. Mansouri, A. Ai, Z.V. Malekshahi, and J. Ai. *Prog Biomater.* (2019); 8: 239–248.
- [32] “Polymeric nanofibrous nerve conduits coupled with laminin for peripheral nerve regeneration,” Wei C., Munish B.S., Gan Z., Kevin W., Swetha R., Sangamesh G.K. and Xiaojun Y., *Biomed Mater.* (2020); 15(3): 035003.
- [33] “Neurite guidance on laser-scribed reduced graphene oxide,” Lee S.H., Lee H.B., Kim Y., Jeong J.R., Lee M.H. and Kang K., *Nano Lett.* (2018); 18: 7421–7427.

- [34] “In vitro and in vivo studies of electroactive reduced graphene oxide-modified nanofiber scaffolds for peripheral nerve regeneration,” Wang J., Cheng Y., Chen L., Zhu T., Ye K., Jia C., Wang H., Zhu M., Fan C. and Mo X., *Acta Biomater.* (2019); 84: 98–113.
- [35] “Directed and enhanced neurite outgrowth following exogenous electrical stimulation on carbon nanotube-hydrogel composites,” Imaninezhad M., Pemberton K., Xu F., Kalinowski K., Bera R. and Zustiak S.P., *J. Neural. Eng.* (2018); 15: 056034.
- [36] “Carbon-nanotube-interfaced glass fiber scaffold for regeneration of transected sciatic nerve,” Ahn H.S., Hwang J.Y., Kim M.S., Lee J.Y., Kim J.W., Kim H.S., Shin U.S., Knowles J.C., Kim H.W. and Hyun J.K., *Acta Biomater.* (2015); 13: 324–334.
- [37] “Self-assembling peptide hydrogels functionalized with LN- and BDNF- mimicking epitopes synergistically enhance peripheral nerve regeneration,” Shuhui Y., Chong W., Jinjin Z. and Changfeng L., *Theranostics.* (2020); 10(18): 8227–8249.
- [38] “Additive Manufacturing of Nerve Guidance Conduits for Regeneration of Injured Peripheral Nerves,” Shaochen S., Xuejie W., Tiejun W., Qinghua Y., Zheyu H., Zhe Z. and Rui L., *Front Bioeng Biotechnol.* (2020); 8: 590596.
- [39] “Pores in synthetic nerve conduits are beneficial to regeneration,” Vleggeert-Lankamp C.L.A.M., De Ruiter G.C.W. and Wolfs J.F.C., *J. Biomed. Mater. Res. A.* (2007); 80: 965–982.
- [40] “Diffusion of soluble factors through degradable polymer nerve guides: Controlling manufacturing parameters,” Kokai L.E., Lin Y.C., Oyster N.M. and Marra K.G., *Acta Biomater.* (2009); 5: 2540–2550.
- [41] “Functional recovery following traumatic spinal cord injury mediated by a unique polymer scaffold seeded with neural stem cells,” Teng Y.D., Lavik E.B., Qu X., Park K.I., Ourednik J., Zurakowski D., Langer R. and Snyder E.Y., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2002); 99: 3024–3029.
- [42] “Effect of Surface Pore Structure of Nerve Guide Conduit on Peripheral Nerve Regeneration,” Oh S.H., Kim J.R., Kwon G.B., Namgung U., Song K.S. and Lee J.H., *Effect Tissue Eng. Part C Methods.* (2013); 19: 233–243.
- [43] “A novel approach to align adult neural stem cells on micropatterned conduits for peripheral nerve regeneration: A feasibility study,” Hsu S.H., Su C.H., Chiu I.M., *Artif. Organs* (2009); 33: 26–35.
- [44] “The influence of fiber diameter of electrospun substrates on neural stem cell differentiation and proliferation,” Christopherson G.T., Song H. and Mao H.Q., *Biomaterials.* (2009); 30: 556–564.

- [45] “Differences between the effect of anisotropic and isotropic laminin and nerve growth factor presenting scaffolds on nerve regeneration across long peripheral nerve gaps,” Dodla M.C. and Bellamkonda R.V., *Biomaterials*. (2008); 29: 33–46.
- [46] “Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo,” Levi-Montalcini R. and Hamburger V. *J. Exp. Zool.* (1951); 116: 321–361.
- [47] “Neuroprotection by BDNF against glutamate-induced apoptotic cell death is mediated by ERK and PI3-kinase pathways,” Almeida R.D., Manadas B.J., Melo C.V., Gomes J.R. and Mendes C.S., *Cell. Death Differ.* (2005); 12: 1329–1343.
- [48] “BDNF promotes the axonal regrowth after sciatic nerve crush through intrinsic neuronal capability upregulation and distal portion protection,” J. Zhengab, J. Sunc, X. Lu, P. Zhao, K. Li, L. Li. *Neuroscience Letters* (2016); 621: 1-8
- [49] “NT-3 gene delivery elicits growth of chronically injured corticospinal axons and modestly improves functional deficits after chronic scar resection,” M.H. Tuszynski, R. Grill, L.L. Jones, A. Brant, A. Blesch, K. Löw, S. Lacroix, P. Lu. *Exp. Neurol.* (2003); 181: 47–56.
- [50] “AAV1.NT-3 gene therapy for charcot-marie-tooth neuropathy,” Z. Sahenk, G. Galloway, K.R. Clark, V. Malik, L.R. Rodino-Klapac, B.K. Kaspar, L. Chen, C. Braganza, C. Montgomery, and J.R. Mendell. (2014); 22: 511–521.
- [51] “GDNF synthesis, signaling, and retrograde transport in motor neurons,” A.F. Cintron-Colon, G. Almeida-Alves, A.M. Boynton, and J.M. Spitsberg. *Cell Tissue Res.* (2020); 382(1): 47–56.
- [52] “Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro,” Gerard B., Daniel K., Min Y., James E.H. and David I.G., *Developmental Biology*. (1995); 168(2): 342–357.
- [53] “Transplantation of embryonic stem cells improves nerve repair and functional recovery after severe sciatic nerve axotomy in rats,” Cui L., Jiang J., Wei L., Zhou X., Fraser J.L., Snider B.J. and Yu S.P., *Stem Cells*. (2008); 26: 1356–1365.
- [54] “Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury,” H.S. Keirstead, G. Nistor and G. Bernal, *Journal of Neuroscience*. (2005); 25(19): 4694–4705.
- [55] “Long-distance axonal growth from human induced pluripotent stem cells after spinal cord injury,” Lu P., Woodruff G., Wang Y., Graham L. and Hunt M., *Neuron*. (2014); 83: 789–796.
- [56] “A comparative study of three different types of stem cells for treatment of rat spinal cord injury,” Ruzicka J., Machova-Urdzikova L., Gillick J., Amemori T., Romanyuk N., Karova K.,

Zaviskova K., Dubisova J., Kubinova S., Murali R., Sykova E., Jhanwar-Uniyal M. and Jendelova P., *Cell Transplant.* (2017); 26: 585–603.

[57] “Neural stem cells constitutively secrete neurotrophic factors and promote extensive host axonal growth after spinal cord injury,” P. Lu, L.L. Jones, E.Y. Snyder and M.H. Tuszynski, *Exp. Neurology.* (2003); 181(2): 115–129.

[58] “StemCells, Provides Update on Its Phase I/II Study in Spinal Cord Injury,” StemCells, Newark, Calif, USA, (2014).

[59] “Mesenchymal Stem Cells for Spinal Cord Injury: Current Options, Limitations, and Future of Cell Therapy,” Cofano F., Boido M., Monticelli M., Zenga F., Ducati A., Vercelli A., Garbossa D. *Int J Mol Sci.* (2019); 20 (11): 2698.

[60] “BMSC-derived extracellular matrix better optimizes the microenvironment to support nerve regeneration,” S. Wang, C. Zhu, B. Zhang, J. Hu, J. Xu, C. Xue, S. Bao, X. Gu, F. Ding, Y. Yang, X. Gu, Y. Gu. *Biomaterials* (2022); 280: 121251

[61] “Autologous bone marrow transplantation in patients with subacute and chronic spinal cord injury,” Eva S., Ales H., Radim M., Hynek L., Simona L. K., Petr K., Radek P., Jirí N., Vladimír K., Vladimír V., Jan S. and Martin B., *Cell Transplantation.* (2006); 15(8-9): 675–687.

[62] “The role of undifferentiated adipose-derived stem cells in peripheral nerve repair,” Zhang R. and Rosen J. M., *Neural Regen. Res.* (2018); 13: 757–763.

[63] “Schwann cell-like differentiated adipose stem cells promote neurite outgrowth via secreted exosomes and RNA transfer,” Ching R.C., Wiberg M. and Kingham P.J., *Stem Cell Res. Ther.* (2018); 9: 266–266.

[64] “Human umbilical cord derived mesenchymal stem cells in peripheral nerve regeneration,” C. Bojanic, K. To, B. Zhang, C. Mak, and W.S. Khan. *World J Stem Cells.* (2020); 12 (4): 288–302.

[65] “Regeneration into the spinal cord of transected dorsal root axons is promoted by ensheathing glia transplants,” A. Ramon-Cueto and M. Nieto-Sampedro, *Experimental Neurology.* (1994); 127(2): 232–244.

[66] “Olfactory ensheathing cells in facial nerve regeneration,” M. Lia, Q. Zhub, J. Liua. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology.* (2020); 86 (5): 525-533.

[67] “Autologous olfactory ensheathing cell transplantation in human spinal cord injury,” F. Féron, C. Perry and J. Cochrane, *Brain.* (2005); 128(12): 2951–2960.

[68] “Olfactory mucosal autografts and rehabilitation for chronic traumatic spinal cord injury,” C. Lima, P. Escada and J. Pratas-Vital, *Neurorehabilitation and Neural Repair.* (2010); 24(1): 10–22.

- [69] “Olfactory Ensheathing Cells for Spinal Cord Injury: Sniffing Out the Issues,” R. Yao, M. Murtaza, J.T. Velasquez, M. Todorovic, A. Rayfield, J. Ekberg, M. Barton, and J. St John. *Cell Transplant.* (2018); 27(6): 879–889.
- [70] “Peripheral Nerve Regeneration through Hydrogel-Enriched Chitosan Conduits Containing Engineered Schwann Cells for Drug Delivery,” Meyer C., Wrobel S., Raimondo S., Rochkind S., Heimann C., Shahar A., Ziv-Polat O., Geuna S., Grothe C., Haastert-Talini K. *Cell Transplant.* (2016); 25 (1): 159-82
- [71] “Laminin-chitosan-PLGA conduit co-transplanted with Schwann and neural stem cells to repair the injured recurrent laryngeal nerve,” Li Y., Yu Z., Men Y., Chen X., Wang B. *Exp Ther Med.* (2018); 16 (2): 1250-1258.
- [72] “Alginate hydrogel and matrigel as potential cell carriers for neurotransplantation,” Liudmila N.N., Afshin M., Mikael W., Giorgio T., Jan O.K. and Lev N.N., *Journal of Biomedical Materials Research—Part A.* (2006); 77(2):242–252.
- [73] “New serum-derived albumin scaffold seeded with adipose-derived stem cells and olfactory ensheathing cells used to treat spinal cord injured rats,” A. Ferrero-Gutierrez, Y. Menendez-Menendez, M. Alvarez-Viejo, A. Meana and J. Otero, *Histology and Histopathology.* (2013); 28(1): 89–100.
- [74] “Collagen-chitosan scaffold impregnated with bone marrow mesenchymal stem cells for treatment of traumatic brain injury,” Yan F., Li M., Zhang H.Q., Li G.L., Hua Y., Shen Y., Ji X.M., Wu C.J., An H. and Ren M. *Neural Regen Res.* (2019);14 (10): 1780-1786.
- [75] “3D-printed nerve guidance conduits multi-functionalized with canine multipotent mesenchymal stromal cells promote neuroregeneration after sciatic nerve injury in rats,” Rodríguez-Sánchez D.N., Pinto G.B.A., Cartarozzi L.P., de Oliveira A.L.R., Bovolato A.L.C., de Carvalho M., da Silva J.V.L., Dernowsek J.A., Golim M., Barraviera B., Ferreira R.S., Deffune E., Bertanha M., Amorim R.M. *Stem Cell Res Ther.* (2021); 12 (1): 303.
- [76] “Significant Improvement of Acute Complete Spinal Cord Injury Patients Diagnosed by a Combined Criteria Implanted with NeuroRegen Scaffolds and Mesenchymal Stem Cells,” Xiao Z., Tang F., Zhao Y., Han G., Yin N., Li X., Chen B., Han S., Jiang X., Yun C., Zhao C., Cheng S., Zhang S., Dai J. *Cell Transplant.* (2018); 27 (6): 907-915.
- [77] “Gene therapy for the peripheral nervous system: a strategy to repair the injured nerve?”, Mason M.R., M.R. Tannemaat, M.J. Malessy and J. Verhaagen, *Gene Curr.* (2011); 11: 75-89. Cronin J. and Zhangand J.R., *Curr Gene Ther* (2005); 5: 387-398.
- [78] “Non-viral vectors for 488gene-based therapy,” Yin H., R. Kanasty, A. Eltoukhy, A. Vegas, J. Dorkin and D. Anderson, *Nat Rev Genet.* (2014); 15: 541-555.