



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**



DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

**“BIOMATERIALI PER IL TRATTAMENTO DI DISTURBI
NEURODEGENERATIVI”**

Relatore: Prof. Andrea Bagno

Laureanda: Angela Maschio

ANNO ACCADEMICO 2021 – 2022

Data di laurea 20/09/2022

Indice

Abstract	4
Introduzione	5
Capitolo 1: Malattie e disturbi neurodegenerativi	
1.1 Morbo di Parkinson	6
1.1.1 Caratteristiche macroscopiche	9
1.1.2 Caratteristiche microscopiche	10
1.2 Morbo di Alzheimer	10
1.2.1 Caratteristiche macroscopiche	12
1.2.2 Caratteristiche microscopiche	13
Capitolo 2: Biomateriali per la riparazione neuronale	
2.1 Hydrogel	17
2.2 Nanoparticelle	19
2.2.1 Nanoparticelle per la somministrazione di farmaci al cervello	19
2.3 Self-assembling peptides	21
2.4 Nanofibre	22
2.5 Nanomateriali a base di carbonio	24
2.6 Caratteristiche dei materiali polimerici utilizzati nell'ingegneria tissutale neurale	27
2.6.1 Materiali polimerici per l'ingegneria dei tessuti neurali	27
2.6.1.1 Collagene	27
2.6.1.2 Acido ialuronico	30
2.6.1.3 Derivati dell'acido ialuronico	30
2.6.1.4 Chitina e chitosano	31
2.6.2 Materiali polimerici sintetici	31
2.6.2.1 Acido poli L-lattico (PLLA)	31
2.6.2.2 Acido poli-D, L-lattico-co-glicolico (PLGA)	31
Capitolo 3: Utilizzo dei biomateriali per il morbo di Alzheimer e il morbo di Parkinson	
3.1 Studi condotti sul morbo di Alzheimer	32
3.1.1 Hydrogel nel morbo di Alzheimer	33
3.1.2 Nanoparticelle (NP) per il trattamento del morbo di Alzheimer	34
3.1.3 SAPs per trattare il morbo di Alzheimer	35
3.2 Studi condotti sul morbo di Parkinson	36
3.2.1 Hydrogel nel morbo di Parkinson	39

3.2.2 Nanoparticelle (NP) per il trattamento del morbo di Parkinson	40
3.3 Nanomateriali a base di carbonio per il morbo di Parkinson e di Alzheimer	42
3.3.1 Grafene	42
3.3.2 Nanotubi di carbonio	43
Conclusioni	45
Bibliografia	46

Abstract

Nell'ambito delle malattie neurodegenerative il recupero e la rigenerazione del tessuto nervoso ricoprono un ruolo importante. A livello dell'ingegneria tissutale si stanno studiando nuovi approcci per recuperare i danni irreversibili provocati da queste malattie. Vedremo in questo progetto le diverse tipologie di biomateriali applicati nell'ingegneria tissutale, di come la creazione di scaffold possa aiutare la rigenerazione neuronale e i biomateriali per il trasporto dei farmaci attraverso molecole destinati al cervello. Particolare attenzione si avrà nello studio delle nanoparticelle e degli idrogel per le loro caratteristiche funzionali. L'innovatività di queste ricerche sperimentali, sebbene veda un futuro nel mondo della medicina neuro-degenerativa, è al contempo in fase di sviluppo e presenta ancora ad oggi numerosi svantaggi.

Introduzione

I disturbi neurodegenerativi (NDs) sono una classe di disordini caratterizzati dalla progressiva degenerazione funzionale e strutturale della popolazione neuronale; essi includono il morbo di Alzheimer, il morbo di Parkinson, le lesioni del midollo spinale e la sclerosi laterale amiotrofica (SLA). Numerosi sono i NDs, ognuno dei quali viene considerato come caso separato in quanto hanno sintomi distinti e coinvolgono aree differenti dell'encefalo. Tuttavia, condividono caratteristiche a livello genetico o molecolare come ad esempio la disfunzione vascolare precoce, l'aggregazione e diffusione di proteine mal ripiegate (che porta a disfunzione cellulare), attivazione delle risposte immunitarie, vulnerabilità di particolari neuroni, etc.

La disfunzione cellulare porta alla perdita di sinapsi, e conseguentemente al danneggiamento del cervello. Questa tipologia di proteine mal ripiegate potrà a loro volta propagarsi, diffondendo le loro anomalie tra diverse cellule e tessuti.

Infine, per ogni ND, è stato riportato che le cellule microgliali hanno un ruolo nella neurodegenerazione in quanto possono passare da essere dei neuroprotettori ad avere un ruolo 'distruttivo' e deleterio.

L'elevata complessità del sistema nervoso centrale e l'assenza di soluzioni terapeutiche efficaci a lungo termine portano alla ricerca di continue terapie per la riparazione delle funzioni neuronali e dei tessuti. Nonostante esistano tuttora terapie in grado di alleviare alcuni sintomi fisici o mentali, una cura per fermare la progressione della malattia ancora non esiste.

Il costante aumento dell'aspettativa di vita nei Paesi occidentali porta ad un maggior interesse nello studio della medicina neuro-degenerativa [1].

Capitolo 1. Malattie e disturbi neurodegenerativi

Le principali cause dei danni al sistema nervoso centrale sono: traumi fisici, che possono provocare danni all'encefalo o al midollo centrale; ipossia, ovvero una carenza di ossigeno che porta al danneggiamento di neuroni come nel caso di un ictus; malattie neurodegenerative come l'Alzheimer, il Parkinson o la sclerosi.

La morte delle cellule neuronali è uno dei principali segni delle malattie neurodegenerative. Generalmente diverse regioni primarie del cervello subiscono perdite neuronali, mentre con il progredire della malattia queste regioni possono espandersi. Un cambiamento del volume cerebrale però, non è dovuto solamente ad un cambiamento del numero di neuroni poiché possono influire anche altri fattori, quali la ridotta innervazione degli stessi senza necessariamente contribuire alla morte delle stesse.

L'unità funzionale di base del sistema nervoso è il neurone. Esso risulta formato da un corpo cellulare, da dendriti (che trasportano il segnale dalla loro estremità al corpo cellulare) e da un prolungamento chiamato assone che trasporta il segnale in maniera opposta. Grazie all'assone e ai dendriti, i neuroni comunicano tra loro e con le altre cellule. L'associazione di neuroni e tessuto connettivo dà origine ai nervi, che si estendono dal sistema nervoso agli altri organi in modo da trasmettere segnali. Il danneggiamento dei nervi compromette la trasmissione del segnale causando quindi i disturbi neurologici. Lesioni diverse in sedi diverse del sistema nervoso comportano sintomi differenti, anche se provocate dalla stessa malattia.

Le patologie neurologiche vengono quindi classificate in base al meccanismo patogenetico: morbo di Parkinson e morbo di Alzheimer vengono classificati come malattie neurodegenerative, contraddistinte da perdita delle funzioni motorie o cognitive con progressiva degenerazione nel tempo [2][3][12].

1.1 Morbo di Parkinson

La malattia di Parkinson è una patologia neurodegenerativa cronica e progressiva del sistema nervoso centrale, tipicamente caratterizzata dalla presenza di sintomi motori cardinali quali bradicinesia, rigidità e tremore, ai quali si associa instabilità posturale. Alcuni disordini della malattia sono cronici e progressivi causati da un processo neurodegenerativo della malattia non conosciuto, mentre altri possono avere cause genetiche; altri possono essere transitori e dovuti agli effetti di tossine, disturbi metabolici o farmaci. Alcune tossine producono danni cerebrali duraturi che lasciano cambiamenti strutturali. Pertanto i disturbi parkinsoniani possono essere

sia ereditari (minoranza) che sporadici, ovvero non trasmissibili e non riconducibili ad una specifica alterazione del DNA.

La malattia consegue principalmente alla degenerazione (oltre il 60% all'esordio dei sintomi motori) dei neuroni della pars compacta ¹ della substantia nigra ²; nella parte reticolare sono presenti i neurotrasmettitori inibitori GABA, nella parte compatta è localizzata la maggior parte dei neuroni che sintetizzano la dopamina. Da qui partono grosse proiezioni verso il neostriato (via nigrostriatale), la corteccia limbica (vie mesocorticali) e altre strutture limbiche (vie mesolimbiche).

La caratteristica distintiva neuropatologica del morbo di Parkinson è rappresentata dall'accumulo, soprattutto a livello della substantia nigra, di inclusioni eosinofile filamentose intracitoplasmatiche denominate corpi di Lewy, costituite principalmente da aggregati di una proteina, la α -sinucleina, in forma alterata insolubile. Questa proteina è presente nei terminali dopaminergici e regola il traffico sinaptico delle vesciche. L'aggregazione di questa proteina è stata rilevata a livello di corpo cellulare e neuriti, non solo a livello del tronco encefalico, ma anche nella corteccia e nel sistema nervoso enterico. È in fase di studio determinare se tale alterazione istologica costituisca la patologia primaria, o se sia solo un indicatore del processo di neurodegenerazione.

La diagnosi di Parkinson è principalmente clinica e, allo stato attuale, basata sull'identificazione, durante un approfondito esame neurologico e dopo un'accurata anamnesi, di segni e sintomi caratteristici della patologia (legati al deficit dopaminergico conseguente alla degenerazione nigrostriatale) e sull'esclusione di eventuali sintomi atipici (Figura 1.1).

¹ Formati da neuroni dopaminergici.

² Formazione nervosa del mesencefalo comprendente una parte reticolare e una compatta.

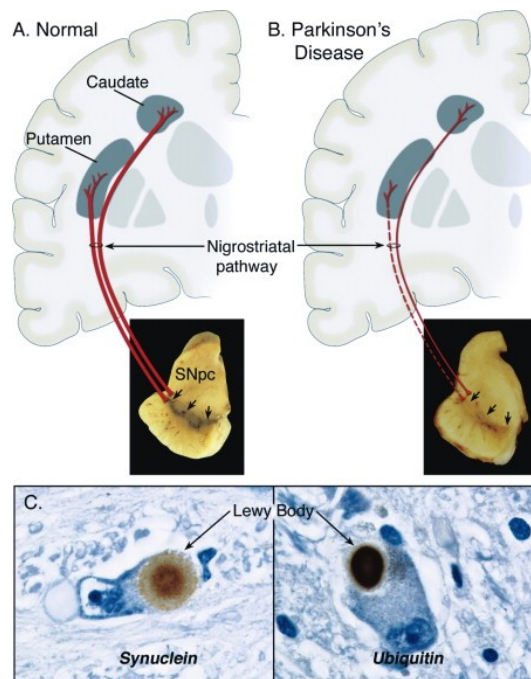


Figura 1.1 Nel morbo di Parkinson la via nigrostriale degenera, con una marcata perdita di neuroni dopaminergici ed un'evidente depigmentazione.

Le uniche terapie disponibili per questa malattia sono quelle sintomatiche e le più comuni sono i trattamenti con L-DOPA o con agonisti della dopamina.

La malattia di Parkinson è caratterizzata da una progressione relativamente lenta e da una evidente risposta alla terapia farmacologica dopaminergica, che può tuttavia perdere di efficacia durante il corso naturale della malattia. Oltre ai sintomi motori sono presenti anche sintomi non motori che si possono manifestare anche prima che le sintomatologie principali compaiano. I sintomi non motori possono divenire rilevanti nelle fasi più avanzate, assumendo un ruolo determinante sulla disabilità e sulla qualità della vita, considerando anche la loro scarsa risposta alla terapia con L-DOPA.

Si dovrà quindi considerare questa malattia come una sindrome complessa, di cui il quadro di deterioramento motorio costituisce solo la parte più visibile.

È stato suggerito che sintomi quali il deficit olfattivo, i disturbi del sonno (REM Sleep Behaviour Disorder), la depressione e la stipsi possano essere presenti anche prima dei disturbi motori. Un ampio corredo di sintomi non motori è stato inoltre descritto nel corso naturale della malattia, quali disturbi neuropsichiatrici e cognitivi (apatia, depressione e ansia, deficit dell'attenzione, demenza, allucinazioni e psicosi, comportamenti ripetitivi e ossessivi, disturbi del controllo degli impulsi) e sintomi disautonomici (disturbi vescicali, della salivazione, ipotensione ortostatica, xerostomia, sintomi gastrointestinali, dolore e parestesie, fatica, perdita di peso).

I criteri diagnostici di ricerca includono, come la diagnosi clinica, la verifica di segni e sintomi che richiedono un'osservazione del paziente nel tempo, anche riguardo la responsività alla terapia dopaminergica. Appare necessaria una costante rivisitazione della diagnosi che risulterà più accurata quanto più il quadro sintomatologico si evolve nel corso della malattia divenendo più chiaro e consentendo la differenziazione tra le diverse sindromi.

L'esame istopatologico, riservato ad una osservazione post-mortem, permette di rilevare le alterazioni strutturali tipiche della malattia, essenzialmente relative alla distribuzione dei corpi di Lewy secondo criteri neuropatologici riconosciuti [1] [3-5][9].

1.1.1 Caratteristiche macroscopiche

Le caratteristiche macroscopiche principali sono il tremore, la bradicinesia (lentezza dei movimenti), la rigidità e l'instabilità posturale. Nella maggioranza dei pazienti insorge come primo segno il tremore ad una mano, che con il sonno scompare e con le emozioni aumenta. Successivamente il tremore colpisce maggiormente entrambe le mani, le braccia e le gambe e possono anche essere interessate la mandibola, la lingua, la fronte e le palpebre. La voce diventa ipofonica e spesso si accompagna a una caratteristica disartria (disturbo del linguaggio) monotona e balbettante. Progressivamente nelle fasi tardive si associano anche deficit di memoria e disturbi comportamentali. Infine va ricordato come alla malattia di Parkinson spesso si associno forme depressive.

Il Parkinson viene definito da numerosi cambiamenti patologici a livello del cervello e degli organi periferici, nonché da tutta una serie di anomalie biochimiche cerebrali conseguenti alla modifica patologica primaria o risultanti da modifiche in risposta alla perdita di dopamina. Ciò comporta l'alterazione di vari neurotrasmettitori oltre alla dopamina, che possono a loro volta contribuire all'insorgenza dei sintomi motori (lentezza, rigidità, tremore e anomalie posturali) e non motori (disturbi del sonno, alterazioni delle sensazioni, declino cognitivo e depressione) del Parkinson.

Riassumendo, la perdita di dopamina nel Parkinson porta a cambiamenti nell'attività elettrica dei neuroni sottostanti al percorso dopaminergico danneggiato, modificando pertanto il rilascio dei neurotrasmettitori che propagano i segnali alle cellule neuronali successive.

Attraverso opportuni esperimenti è stato messo in evidenza il ruolo compensatorio e neuroprotettivo del sistema noradrenergico (di cui il nucleo principale è il locus coeruleus, che è anche il principale nucleo di sintesi della noradrenalina) sul sistema dopaminergico. In effetti, la noradrenalina può legarsi ai recettori dopaminergici attivandoli, ha funzioni trofiche e determina in modelli animali la sopravvivenza dei neuroni dopaminergici; aumenta inoltre la

concentrazione di molecole anti-infiammatorie ed inibisce la formazione di sostanze infiammatorie e sostanze responsabili di stress ossidativo, associate sia a Parkinson che ad Alzheimer [3-5].

1.1.2 Caratteristiche microscopiche

Il morbo di Parkinson, dal punto di vista microscopico, è caratterizzato dalla presenza dei corpi di Lewy. La più importante e abbondante proteina che costituisce i corpi di Lewy è la cosiddetta α -sinucleina, e la sua presenza rappresenta una localizzazione citologica aberrante, poiché è normalmente una componente delle terminazioni nervose presinaptiche, coinvolta nel rilascio di importanti neurotrasmettitori come dopamina e acetilcolina, che si accumula nelle cellule nervose solo quando affette da Parkinson.

La morte cellulare però non può essere direttamente associata ai corpi di Lewy; sono stati identificati altri meccanismi che possono portare alla morte cellulare, come la disfunzione dei lisosomi³ e proteosomi⁴ ed una ridotta attività mitocondriale. Inoltre, l'accumulo di ferro nella substantia nigra si osserva tipicamente in combinazione con le inclusioni proteiche [4][5].

1.2 Morbo di Alzheimer

Il disturbo di Alzheimer è una patologia neurodegenerativa caratterizzata da un forte deficit cognitivo e rappresenta quasi la metà dei casi di demenza negli anziani. Con la progressione della malattia si hanno cambiamenti della personalità e, negli stadi finali, il deterioramento delle altre funzioni cognitive, fino al punto che il soggetto non riesce nemmeno a comunicare con chi lo assiste o a riconoscere le persone a lui più care.

La perdita di memoria, il sintomo clinico più importante nei pazienti di Alzheimer, è correlata alla perdita neuronale nella regione dell'ippocampo. La perseveranza della perdita neuronale è correlata alla progressione della malattia. In particolare, la perdita neuronale rilevabile in più regioni, che precede anche i sintomi clinici della malattia, si verifica nello strato della corteccia entorinale II⁵, nel nucleo basale di Meynert e nel locus coeruleus (Figura 1.2).

³ Sono compartimenti cellulari dotati di membrana cellulare, deputati alla degradazione di svariate sostanze tramite l'azione dell'ambiente acido e di enzimi proteolitici.

⁴ Sono complessi proteici atti a degradare i peptidi.

⁵ È una parte della formazione dell'ippocampo, situata lateralmente nelle regioni mediali dei lobi temporali.

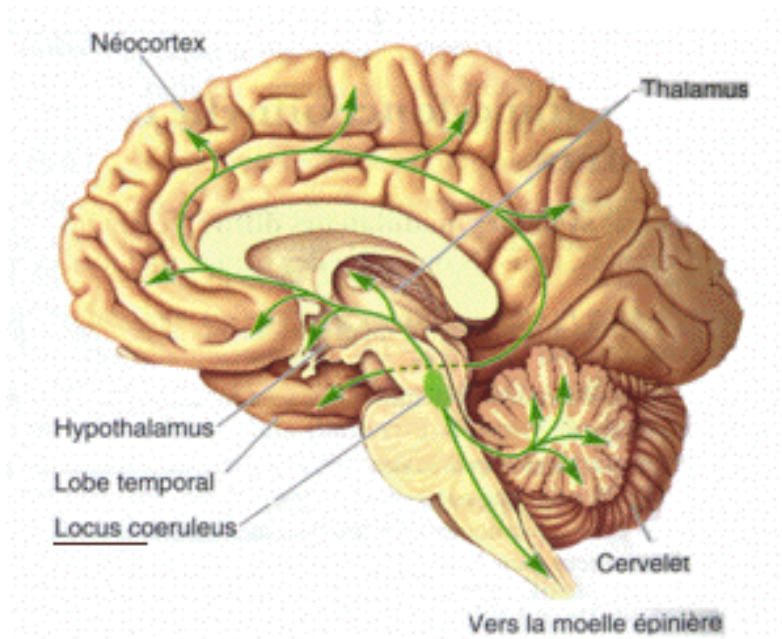


Figura 1.2 Locus coeruleus o punto blu, colorazione dovuta ai granuli di melanina al suo interno. È all'origine della maggior parte delle azioni della noradrenalina nel cervello, ed è coinvolto nelle risposte a stress e panico, ed è collegata al sonno REM.

Oltre alla perdita neuronale in queste zone si verifica la formazione di grovigli neurofibrillari e placche amiloidi. Con l'avanzare della malattia, anche la corteccia frontale e altre regioni corticali/sottocorticali subiscono perdite neuronali che a volte possono essere molto gravi.

Il nucleo basale di Meyert è un gruppo di cellule nervose con ampie proiezioni alla neocorteccia. Il nucleo gioca un ruolo essenziale attraverso i suoi assoni diretti all'intera corteccia, fornendo a quest'ultimo il contributo massimo di acetilcolina. Dal nucleo basale di Meynert parte l'80% dei neuroni colinergici che facilita un'ampia gamma di funzioni cognitive come la memoria: questo spiega la correlazione tra Alzheimer e la compromissione della stessa.

La classe di neuroni che subisce evidenti cambiamenti sono i neuroni aminergici. Essi si suddividono in: monoaminergici se utilizzano le monoamine biogene (serotonina e catecolamine) come neurotrasmettitori; colinergici, se sfruttano invece l'acetilcolina; aminoacidergici se utilizzano come neurotrasmettitori aminoacidi o frammenti di essi.

Uno degli interventi più consistenti per rallentare l'avanzamento della malattia è la riduzione della degradazione dell'acetilcolina (ACh), il neurotrasmettitore responsabile della trasmissione colinergica, in modo che il neurotrasmettitore non si accumuli tra le cellule nervose e non causi quindi complicazioni.

Anche i neuroni glutammatergici sono coinvolti nel disturbo di Alzheimer e sono responsabili della perdita di gran parte dei neuroni nella corteccia celebrale e nell'ippocampo. L'anormale funzione glutammatergica è di fatto un fattore causale nel disturbo di Alzheimer. Essendo i

sintomi del disturbo associati ad un'alterazione della funzione colinergica, la ricerca si è focalizzata sul sistema colinergico del prosencefalo basale e su alcuni dei neurotrasmettitori che originano nel mesencefalo, come dopamina, norepinefrina e serotonina. Tuttavia, il motivo per cui questi neurotrasmettitori cambino e quali meccanismi siano alla base della degenerazione di questi specifici sistemi sono ancora sconosciuti. Fino ad oggi, sono stati identificati quattro specifici geni, detti geni mutanti, associati a quattro proteine differenti, i quali, in condizioni alterate, causano o predispongono un individuo al disturbo di Alzheimer: gene del precursore della proteina amiloide (APP); gene della presenilina-1 (PS-1); gene della presenilina-2 (PS-2); gene dell'apolipoproteina (ApoE4).

Non è semplice stabilire direttamente la sequenza degli eventi patogeni del disturbo. Si sa però che il primo componente da cui origina è la disfunzione del gene che produce l'amiloide. L'amiloide provoca infiammazione attorno alle placche amiloidi e dà il via ad una serie di cambiamenti, i quali portano alla sovrapproduzione di prostaglandine e all'aumento della concentrazione extracellulare di glutammato. L'incremento del livello di glutammato contribuisce, poi, alla morte finale dei neuroni [3][7][13].

1.2.1 Caratteristiche macroscopiche

A livello macroscopico si può osservare nel morbo di Alzheimer un grado variabile di atrofia corticale, simmetrica e diffusa, caratterizzata da ingrandimento dei solchi parietali, più accentuato nei lobi frontali, temporali e parietali, e con appiattimento delle circonvoluzioni cerebrali. L'atrofia osservata risulta molto più accentuata in pazienti in corso di malattia da più di 10 anni. Questa atrofia viene compensata da un ingrossamento delle cavità ventricolari, secondario alla perdita di parenchima. Nel polo temporale, i gradi di atrofia della sostanza bianca sottocorticale e il cambiamento di colore brunastro sono molto evidenti (Figura 1.3).

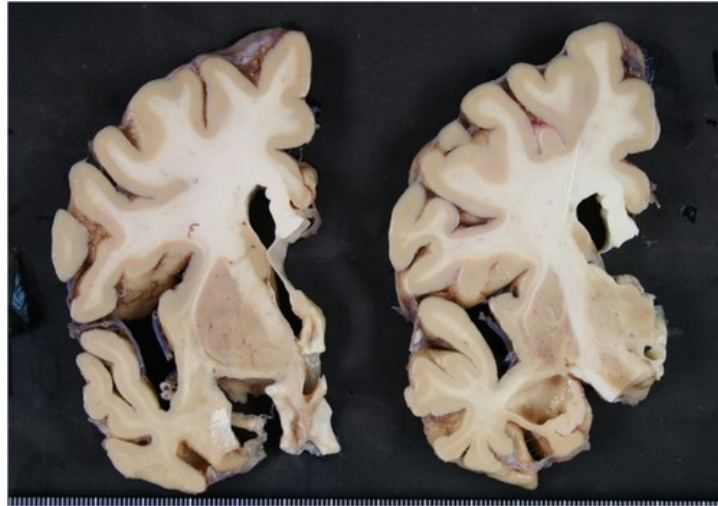


Figura 1.3 Sezione del cervello di un paziente affetto da Alzheimer: si nota atrofia nella parte mediale del lobo temporale.

Si osserva inoltre una diffusa perdita di massa neuronale a livello della corteccia cerebrale, del cervelletto, dei gangli della base, del tronco encefalico e del midollo spinale. In particolare tale depauperamento interessa alcune specifiche regioni dell'encefalo come il nucleo basale di Meynert, i nuclei del setto e la banda diagonale di Broca. La diminuita concentrazione di acetilcolina che si osserva nei pazienti affetti da morbo di Alzheimer sarebbe dovuta alla perdita neuronale in tali nuclei, responsabili di proiezioni colinergiche a tutta la corteccia.

La presenza di microsanguinamenti corticali petecchiali o anche evidenti emorragie lobari, in particolare nei lobi parietale posteriore e occipitale, è un'altra caratteristica macroscopica che può portare al sospetto di una grave angiopatia amiloide cerebrale⁶. Nella malattia di Alzheimer, diversamente da ciò che accade nel disturbo parkinsoniano, la substantia nigra ha una colorazione normale ed inoltre il locus coeruleus è affetto già dai primi stadi del disturbo [7][9].

1.2.2 Caratteristiche microscopiche

A livello microscopico, particolarmente significativo appare l'impovertimento sinaptico, che risulta sostanziale nel determinare pesanti conseguenze funzionali, poiché compromette la neurotrasmissione e riduce considerevolmente le possibilità di interazione tra i neuroni.

Grovigli neurofibrillari, placche amiloidi, oligomeri di β -amiloide e neuroinfiammazioni sono solo alcuni esempi che giocano un ruolo nella patogenesi del morbo di Alzheimer, nella perdita neuronale e quindi nel declino delle funzioni cognitive.

⁶ È una forma di angiopatia nella quale si formano depositi di materiale amiloide, solitamente nella forma della β -amiloide, sulle pareti dei vasi sanguigni del sistema nervoso centrale.

I grovigli, o ammassi neurofibrillari si formano con la deposizione di aggregati di proteine TAU⁷ prevalentemente nei neuroni della corteccia trans-entorinale e successivamente dell'ippocampo e dell'amigdala. I grovigli neurofibrillari sono composti principalmente dalla forma iperfosforilata delle proteine TAU, le quali sono associate al citoscheletro dei neuroni. Presenti nella forma fosforilata, le proteine TAU sono coinvolte nell'accrescimento dei microtubuli portando a grovigli che compromettono la comunicazione tra neuroni e pregiudicano il trasporto assonale.

Le placche di sostanza amiloide sono depositi extracellulari del peptide β -amiloide ($A\beta$). In seguito al rilascio neuronale, i monomeri di $A\beta$ iniziano a depositarsi nello spazio extracellulare costituendo strutture sovra-ordinate: dimeri, trimeri, oligomeri, protofibrille, fibrille e infine placche amiloidi. Queste placche sono sottoposte a continui processi di rimodellamento. La classificazione morfologica consente di discriminare tra placche diffuse, classiche e compatte. La densità delle placche senili non è però proporzionale alla gravità della demenza e la loro presenza è riscontrabile anche nel cervello di individui anziani non dementi.

Le lesioni neuropatologiche, come le placche di amiloidi o i grovigli neurofibrillari, rappresentano solo la punta di un iceberg della sintomatologia che causa il deficit cognitivo. Lo sviluppo di nuovi biomarcatori e strumenti di imaging ha permesso di stimare che il loro accumulo avviene un decennio prima della diagnosi clinica di demenza. La perdita sinaptica, neuronale, i cambiamenti di plasticità e la presenza di forme oligomeriche microscopiche solubili di $A\beta$ e di TAU, evidentemente contribuiscono al progressivo decadimento neuronale. Una comprensione della malattia è necessaria per mettere in atto strategie di prevenzione prima che il danno al sistema nervoso sia irreparabile [3][7][11].

⁷ La proteina TAU contribuisce al funzionamento dei nervi e se non correttamente funzionante porta alla formazione di depositi proteici che causano la morte delle cellule nervose.

Capitolo 2. Biomateriali per la riparazione neuronale

Negli ultimi anni, molti studi si sono concentrati sul ripiegamento errato delle proteine. Questi studi si pongono l'obiettivo di inibire la produzione della proteina coinvolta nella malattia, inibire l'aggregazione di tali proteine, rimuoverne e prevenirne la diffusione e attenuarne l'effetto tossico. A tal fine sono stati sviluppati agenti chimici in grado di inibire l'aggregazione proteica aberrante, modulatori chimici dell'autofagia e anticorpi specifici al fine di eliminare eventuali proteine mal ripiegate.

Un altro aspetto terapeutico emerso negli ultimi anni è l'utilizzo delle cellule staminali come nuovo approccio nel trattamento di patologie come il morbo Parkinson o di Alzheimer. Questo grazie al fatto che le cellule staminali hanno la capacità di rinnovarsi continuamente e sono in grado di differenziarsi in quasi tutti i tipi cellulari. Diverse linee di cellule staminali sono state esplorate negli ultimi anni. Le cellule staminali mesenchimali (MSC) sembrano essere le più adatte grazie alla loro elevata disponibilità, quantità soddisfacenti e immunogenicità molto bassa. Inoltre, possono anche differenziarsi in neuroni e in cellule gliali se coltivate in specifiche condizioni. Le MSC possono essere ottenute da diversi tessuti, ma le più studiate sono quelle del cordone ombelicale (UC-MSC), del midollo osseo (BMSC) e del tessuto adiposo (ASC).

Nonostante siano state testate in molti studi e sperimentazioni cliniche per diversi ND, la complessità del tessuto neurale limita l'utilizzo delle MSC; limiti che devono essere superati per il loro uso clinico terapeutico. Il fattore più importante è la mancanza di correlazione tra il comportamento in vitro e in vivo delle cellule staminali, poiché il microambiente è essenziale per la loro differenziazione.

Per questo motivo, un'importante sfida da superare per l'uso terapeutico delle cellule staminali in vivo è rappresentata dalla comprensione dei segnali chimici e fisici circostanti, nonché delle interazioni cellula-cellula. Tali caratteristiche possono essere studiate introducendo biomateriali per la costruzione di specifici scaffold da utilizzare in modelli sia in vitro che in vivo. Gli scaffold sono molto promettenti per la generazione di innovativi sistemi di coltura 3D e per applicazioni in vivo volte a migliorare l'effetto delle cellule staminali nel trattamento delle lesioni cerebrali. Infatti, la capacità degli scaffold bioingegnerizzati di imitare l'ambiente della matrice extracellulare (ECM) consente una migliore infiltrazione cellulare, con conseguente miglioramento della proliferazione e corretta differenziazione. Infine, la capacità di controllare il comportamento cellulare attraverso la funzionalizzazione suggerisce che questi scaffold siano ideali per essere combinati con le cellule nel campo della rigenerazione neurale.

Scaffold di polimeri di due o tre dimensioni vengono progettati per la riparazione di tessuti. Questi scaffold polimerici comprendono membrane polimeriche a film sottile, dispositivi 3D convenzionali, scaffold impiantabili o iniettabili come possiamo vedere in figura (Figura 2.1).

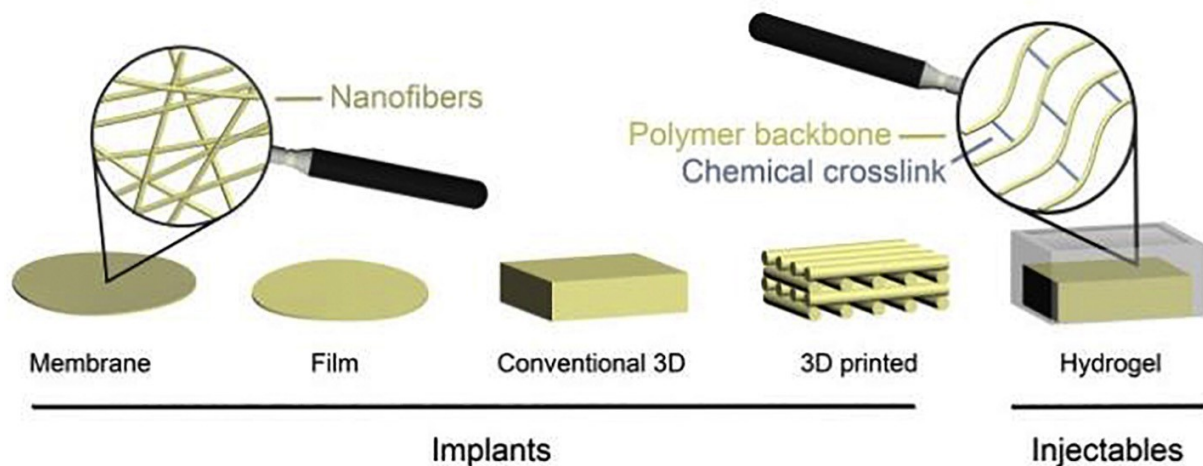


Figura 2.1 Illustrazione delle diverse classi di scaffold di polimeri: impiantabili ed iniettabili.

La loro combinazione con approcci rigenerativi risulta un efficace trattamento per i disturbi neurodegenerativi.

La medicina rigenerativa ha un ruolo importante per la rigenerazione del tessuto e per bloccare la progressione delle malattie. La distribuzione delle cellule, la loro sopravvivenza e la loro integrazione con il tessuto ospite sono le sfide principali per la medicina rigenerativa.

Scaffold polimerici e idrogel iniettabili sono stati sviluppati per imitare la matrice extracellulare delle cellule.

I biomateriali utilizzati devono essere caratterizzati dalla capacità di interagire con i tessuti biologici senza provocare effetti indesiderati ed avversi. I biomateriali devono essere perciò biocompatibili, biodegradabili, biofunzionalizzabili e sterilizzabili. Il vantaggio nell'utilizzo di biomateriali nella progettazione di terapie di rigenerazione del tessuto cerebrale è stato studiato in vari modelli preclinici. In particolare è stato dimostrato che i biomateriali derivanti da fonti naturali migliorano la sopravvivenza delle cellule trapiantate, integrandosi meglio con il tessuto ospite.

Si riportano di seguito i materiali utilizzati per la riparazione neuronale [1][14][15].

2.1 Hydrogel

L'encefalo, essendo l'organo maggiormente delicato e morbido, necessita di un innesto di materiale che corrisponda alle sue caratteristiche fisiche e meccaniche per non causare ulteriori danni. Nonostante ad oggi nessuno scaffold ingegnerizzato sia stato testato su soggetti umani, sono emersi risultati positivi sullo studio di scaffold a base di idrogel in modelli di roditore. La somiglianza anatomica dell'encefalo umano e di roditore e dei meccanismi di plasticità consentono di prevedere l'efficacia di questi scaffold nell'uomo.

Gli idrogel sono reti polimeriche tridimensionali, altamente idratate e insolubili in acqua tenute insieme da legami fisici e/o chimici. Si chiamano gel fisici quando gli entanglement molecolari o le forze secondarie sono i legami più importanti nella formazione della rete; questi tipi di gel sono reversibili al variare di condizioni come la temperatura o il pH. Nei gel chimici la rete si ottiene reticolando chimicamente i polimeri.

Esistono due metodi per preparare idrogel chimici, e questi sono la polimerizzazione tridimensionale in cui un monomero idrofilico viene polimerizzato da un agente reticolante; e la reticolazione diretta di polimeri solubili in acqua. 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 sono appunto importanti da studiare per la loro capacità di contenere una grande quantità di molecole d'acqua. Esistono diverse tipologie di idrogel, naturali e sintetici, alcuni dei quali sono stati studiati e utilizzati da soli, o in miscela a diversi rapporti, nel campo della neurodegenerazione e rigenerazione. Si tratta di idrogel naturali come acido ialuronico (HA), xiloglucano, collagene, alginato di sodio e gelatina, ma anche sintetici come poliacrilammide e polietilenglicole.

Gli idrogel possono essere utilizzati per la somministrazione di farmaci e di cellule nello studio e nel trattamento dei disturbi neurodegenerativi. Diverse sono le tipologie di cellule che possono essere incapsulate in strutture di idrogel 3D, che verranno poi impiantate nel tessuto cerebrale, oppure l'idrogel stesso può essere impiantato in uno stato pregel, che poi formerà un gel direttamente nel cervello, consentendo una più precisa localizzazione delle cellule impiantate. Le strutture 3D consentono la crescita delle cellule in un ambiente permissivo in cui sono possibili sia l'ingresso di ossigeno e di sostanze nutritive, che l'uscita di prodotti di scarto. Inoltre, la struttura 3D può fungere da barriera per le cellule infiammatorie o per fattori avversi nel tessuto ospite.

Le interessanti proprietà fisiche degli idrogel, come la porosità, offrono enormi vantaggi nelle applicazioni di somministrazione di farmaci, ad esempio per i sistemi di rilascio controllato. Il principio attivo trattenuto all'interno del biomateriale viene gradualmente rilasciato, a garanzia

di una concentrazione plasmatica costante nel tempo; il meccanismo di rilascio dipende da diffusione o rigonfiamento, oppure può essere di tipo chimico o basato su alcuni stimoli ambientali.

La somministrazione di farmaci a diffusione controllata con idrogel utilizza dispositivi a serbatoio o a matrice che consentono il rilascio di farmaci attraverso una rete di idrogel o pori riempiti d'acqua.

Nel sistema di rilascio a serbatoio, la membrana di idrogel riveste un nucleo contenente il farmaco e vengono prodotte capsule, sfere o lastre aventi un'elevata concentrazione di farmaco. Questa concentrazione elevata è mantenuta al centro del sistema per facilitare un rilascio del farmaco costante nel tempo. Mentre il sistema di rilascio a serbatoio è indipendente dal tempo e a rilascio costante, il sistema a matrice funziona tramite i pori o reti macromolecolari. Questa modalità di rilascio controllato è dipendente dal tempo in quanto il tasso iniziale di rilascio è proporzionale alla radice quadrata del tempo, anziché essere costante (Figura 2.2).

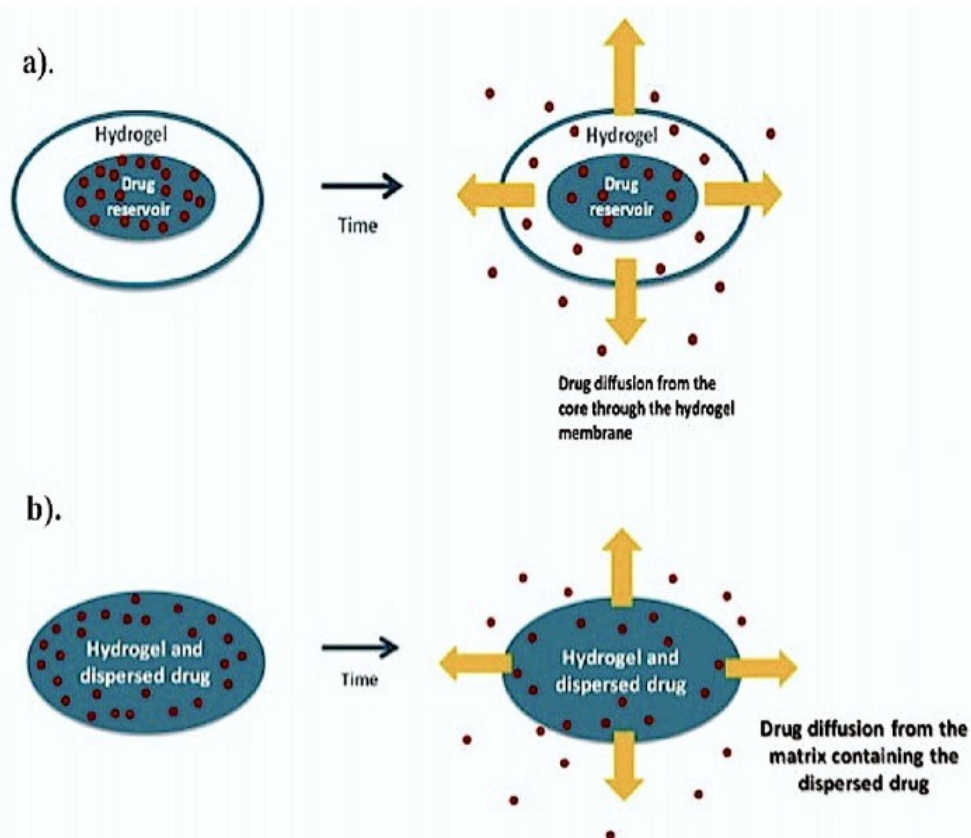


Figura. 2.2 Sistemi per il rilascio controllato di farmaci: (a) nel sistema di rilascio a serbatoio il nucleo contenente il farmaco è rivestito con una membrana di idrogel e la maggiore concentrazione del farmaco è contenuta al centro del sistema per consentire una velocità di rilascio costante; (b) nel sistema a matrice la dissoluzione o la dispersione uniforme del farmaco avviene attraverso la struttura 3D dell'idrogel.

Gli idrogel biocompatibili, biodegradabili e iniettabili composti da acido ialuronico (HA) e metilcellulosa (MC) possiedono una rapida gelificazione e la capacità di mantenere la vitalità

cellulare. Hanno quindi mostrato un alto potenziale come scaffold per il trapianto cellulare [1][14] [17-19].

2.2 Nanoparticelle

Il passaggio di farmaci verso il cervello è in parte ostacolato dalla Blood Brain Barrier (BBB)⁸. Tuttavia per alcune terapie è necessario aumentare la concentrazione dei farmaci al cervello; è per questo che si può applicare la nanotecnologia nell'ambito delle malattie neurodegenerative.

Ci sono diversi tipi di dispositivi nella nanotecnologia come: nanoparticelle, nanofibre, nanotubi, nanosfere e nanogel.

Le nanoparticelle sono le preferite per le loro caratteristiche: piccole dimensioni e ampia superficie. Possono essere composte da diversi materiali come ceramiche, metalli, polimeri, sali ed ossidi.

Le nanoparticelle di silice sono quelle utilizzate più frequentemente data la loro estesa superficie e per il volume dei loro pori; hanno inoltre una buona biocompatibilità, un basso costo e la loro misura è facile da controllare [1][20].

2.2.1 Nanoparticelle per la somministrazione di farmaci al cervello

Le nanoparticelle hanno assunto un ruolo molto importante nel rilascio di molecole di farmaci verso il cervello. Nanosfere, nanosospensioni, nano-emulsioni, nanogel, nano-micelle e nano-liposomi, nanoparticelle polimeriche, nanotubi di carbonio, nano fibre e nano-robot, vettori lipidici nanostrutturati (NLC) e coniugati di farmaci lipidici (LDC) sono i principali nano-sistemi impiegati nei disturbi del sistema nervoso centrale. La Figura 2.3 rappresenta le tipologie di nanoparticelle preferibili per applicazioni biomediche.

⁸ Barriera ematoencefalica, ovvero una barriera protettiva verso le sostanze in entrata al cervello formata dalle cellule endoteliali dei microvasi cerebrali.

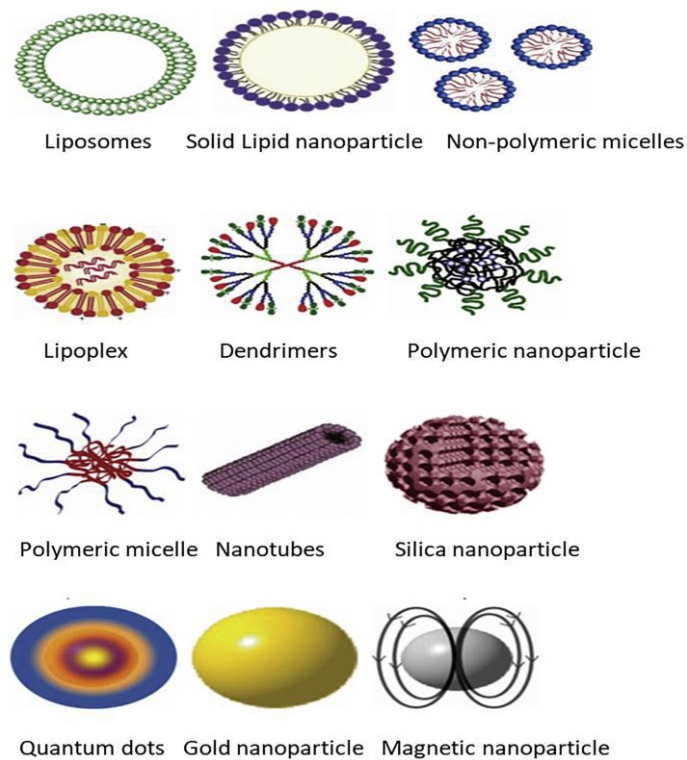


Figura 2.3 tipologie di nanoparticelle applicate per applicazioni biomediche.

Oltre alla loro capacità di attraversare la BBB, i vantaggi dovuti alle nanoparticelle sono il minor dosaggio di farmaco utilizzato e il minor numero di effetti collaterali. La capacità di facilitare il passaggio attraverso la barriera ematoencefalica è una caratteristica necessaria affinché il farmaco arrivi correttamente all'encefalo. Questo è il motivo per cui vengono 'caricati' farmaci all'interno di nanoparticelle che riusciranno di conseguenza ad attraversarla. Tuttavia, non tutte le particelle sono in grado di attraversare la barriera ematoencefalica e devono quindi essere considerati diversi fattori quando si sviluppa un sistema di trasporto per questo scopo. A seconda del percorso necessario per attraversare la barriera, verranno selezionati il materiale delle nanoparticelle, le dimensioni e le proprietà della superficie che dovranno essere adattate per quel percorso specifico.

Le nanoparticelle ottimizzate vengono utilizzate per il passaggio attraverso la barriera ematoencefalica sfruttando le vie di transitosi (passaggio di macromolecole da un lato della cellula all'altro) mediate da recettori e mediate dal recettore AMT (Absorptive-Mediated Transcytosis) per il passaggio di nanoparticelle attraverso la BBB. Le nanoparticelle attraversano completamente la barriera e il loro rilascio è potenziato da convezione.

Nella transitosi mediata da recettori viene preparata una formulazione contrassegnata con un ligando specifico per un recettore, facendo in modo che si leghi a quest'ultimo. Una volta verificato il legame con il recettore del ligando, si verifica l'endocitosi mediata da recettore.

Dopo il passaggio del complesso farmaco-recettore all'interno del citoplasma endoteliale avviene l'esocitosi del farmaco sulla superficie abluminale. Durante il transito all'interno del citoplasma endoteliale, diversi enzimi, lisosomi ed endosomi entrano in contatto con il complesso farmaco-recettore e possono o meno degradare il complesso. Pertanto, è necessario sviluppare una formulazione che sia stabile in presenza di tali enzimi e lisosomi.

La transitosi mediata dal recettore AMT coinvolge il legame elettrostatico di peptidi o proteine policationiche, agenti come ligandi, con frazioni micro-anioniche presenti sulla superficie luminale delle cellule endoteliali. Nonostante questa tipologia di transitosi abbia affinità di legame inferiore rispetto alla transitosi mediata da recettori, essa consente maggiori capacità di legame.

L'albumina cationizzata è un esempio di ligando, riportato per essere coniugato con deferasirox, un agente chelante del ferro, per il morbo di Alzheimer. Nel morbo di Alzheimer, il ferro svolge un ruolo importante nello stress ossidativo e nella degradazione delle proteine, con conseguente danno neuronale. Grazie a diversi studi in vitro e in vivo, è stato confermato che un tale sistema con albumina cationizzata ha prodotto una maggiore protezione neuronale e una riduzione del deficit di apprendimento indotto dall'amiloide β , indicando un'efficiente somministrazione di farmaci al cervello tramite AMT. Similmente, l'albumina di siero bovino cationico è stata sviluppata come ligando per la preparazione di nanoparticelle di polietilenglicole (PEG)-acido polilattico, mostrando una migliore transitosi cerebrale attraverso la barriera ematoencefalica. Sebbene il miglioramento della somministrazione di farmaci al cervello caricate attraverso nanoparticelle sia molto buono, è ancora quantitativamente ostacolato rispetto ai farmaci liberi [1][8] [20-22].

2.3 Self-assembling peptides

I self-assembling peptides (SAPs) possono essere monomeri o sequenze di aminoacidi assemblate per formare nanostrutture come tubi o fogli, consentendo ai peptidi di presentare le proprie funzionalità sulla superficie di queste strutture. Queste ultime hanno differenti attività biochimiche e fisico chimiche dipendenti dalla morfologia, dalla dimensione e dalla accessibilità all'area di superficie attiva. L'autoassemblaggio dei peptidi può essere controllato da pH, forza ionica o trigger enzimatici.

I vantaggi di queste strutture sono la loro biocompatibilità e la facilità di sintesi.

Ci sono diverse tipologie di SAPs. I più semplici sono i dipeptidi, che si assemblano in strutture dell'ordine di nanoscala.

I peptidi tensioattivi sono invece caratterizzati da una struttura anfifilica, con coda idrofobica e testa idrofilica. Quando disciolti in acqua, questi tipi di peptidi si assemblano per ridurre al minimo il contatto della coda con l'acqua. In questo modo possono formare nanotubi o nanovesicole e possono acquisire una funzione simile a quella delle micelle lipidiche. La modifica più comune dei peptidi con una coda idrofobica e una testa idrofilica è il collegamento con una catena alchilica idrofobica; quando combinata con una catena alchilica in una soluzione acquosa, la coda idrofobica forma una struttura 3D, simile a quanto accade durante il ripiegamento delle proteine.

I peptidi ionico-complementari sono caratterizzati da una disposizione alternata di residui caricati 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.

I peptidi autoassemblanti consentono la formazione di diverse nanostrutture: nanofibre; nanotubi, che sono simili alle nanofibre, ma con un foro nella parte interna dove possono essere caricati diversi farmaci; nanoparticelle, che vanno dalle nanosfere a varie strutture solide; nanonastri; e idrogel.

Negli ultimi anni, i peptidi autoassemblanti sono stati utilizzati in molti campi (ad esempio, nella somministrazione di farmaci e nella rigenerazione neuronale) per quanto riguarda i disturbi neurodegenerativi.

Il peptide Tat (YGRKKRRQRRR) è in grado di penetrare attraverso la membrana cellulare, mentre la sua forma modificata, il peptide Tat-polietilenglicole-b-colesterolo (Tat-PEG-b-col), che è in grado di formare micelle, è stato utilizzato per la somministrazione di farmaci tramite la barriera ematoencefalica [1][14].

2.4 Nanofibre

Sebbene siano stati condotti molti studi sulla rigenerazione dei neuriti e sulla formazione di sinapsi, solo alcuni di essi sono stati riportati per il trattamento dei disturbi neurodegenerativi e tutti si sono concentrati sulla differenziazione delle cellule staminali in neuroni dopaminergici per un futuro trattamento del morbo di Parkinson. Molti materiali possono essere utilizzati per produrre nanofibre per la rigenerazione dei neuriti, portando all'ottenimento di diversi scaffold con varie caratteristiche interessanti. Una caratteristica fondamentale che devono possedere è il corretto allineamento, che le rende particolarmente utili per la ricrescita degli assoni e per la trasmissione del segnale. Subramanian e colleghi hanno testato l'effetto delle nanofibre allineate e casuali sulle cellule di Schwann e sulla proliferazione cellulare, trovando un effetto migliorato

delle nanofibre allineate. Uno studio simile ha dimostrato l'effetto delle nanofibre allineate nelle cellule neurali staminali (NSC) derivate da iPSC [24].

Lin e colleghi [25] hanno scoperto che le nanofibre di acido poli-L-lattico erano in grado di promuovere l'adesione, la crescita, la sopravvivenza e la proliferazione delle NSC, ma, cosa più importante, le nanofibre allineate guidavano la crescita dei neuriti dalle NSC e promuovevano significativamente la crescita dei neuriti secondo la direzione delle nanofibre.

Le nanofibre possono essere composte da materiali sintetici, ma anche essere generate a partire da composti naturali; esse possono inoltre essere caricate con farmaci e, a tal fine, Lau e colleghi [26] hanno studiato l'effetto delle nanofibre di chitosano caricate con genipina. In questo studio hanno riscontrato una maggiore rigidità, resistenza al gonfiore e degradazione lisozimale delle nanofibre, con un conseguente miglioramento dell'allineamento e della proliferazione della coltura cellulare di Schwann. Infine, in un modello di rigenerazione dei nervi periferici, il tasso di crescita dei neuriti su nanofibre trattate con genipina ha dimostrato un aumento del 100%.

Le nanofibre possono essere prodotte utilizzando materiali ad elevata biocompatibilità, per questo molti studi sono stati condotti in vivo, ottenendo spesso risultati promettenti.

Farzamfar e colleghi [27] hanno testato prima in vitro e poi in vivo un composito di fogli di policaprolattone/nanofibre di carbonio, scoprendo che tali fogli di nanofibre impiantati nel nervo sciatico di roditore promuovevano l'adesione cellulare, la proliferazione e la crescita dei neuriti. Un'altra utile funzionalizzazione del policaprolattone è stata ottenuta con la laminina. Chang e colleghi [28] hanno scoperto che la funzionalizzazione era essenziale per la corretta organizzazione delle cellule neurali in modelli di roditore che presentavano una lesione nervosa. Inoltre, hanno trovato numerose nuove strutture simili a capillari sanguigni attorno al nervo rigenerato, portando gli autori a ipotizzare che la formazione di nuovi vasi sanguigni potrebbe essere uno dei fattori chiave per una rigenerazione funzionale del nervo.

Le nanofibre possono essere caricate non solo con peptidi o farmaci, ma anche con una combinazione di questi due composti per ottenere un effetto sinergico nella rigenerazione neurale. La possibilità di iniettare nanofibre potrà aprire nuove possibilità di studio delle lesioni del midollo spinale [1].

2.5 Nanomateriali a base di carbonio

Le cellule neurali e i tessuti nervosi hanno la proprietà unica di generare e trasmettere segnali elettrici. Infatti, i canali del sodio controllati dal voltaggio⁹ trasmettono il segnale nervoso come un'onda elettrica lungo il nervo, influenzando oltre l'attivazione dei neuroni anche la proliferazione, la migrazione e la funzione cellulare. Questo è il motivo per cui gli stimoli elettrici sono uno strumento promettente per metodi non-chimici per la rigenerazione del tessuto neurale.

La più grande sfida sarà quella di sviluppare biomateriali elettroattivi e biocompatibili, che contribuiscano alla crescita cellulare e al passaggio di segnali elettrici.

I nanomateriali a base di carbonio (come il grafene o i nanotubi di carbonio, CNTs) hanno proprietà fisiche, chimiche e meccaniche fondamentali per la rigenerazione neuronale.

Il problema, tuttavia, è quello della loro scarsa biocompatibilità che può portare a problemi di sicurezza come stress ossidativo, produzione di radicali liberi, accumulo preossidativo del prodotto, danneggiamento del DNA, e infiammazione. Questi problemi non possono essere sottovalutati, ma le proprietà di conduttori dei nanomateriali a base di carbonio potrebbero rappresentare uno strumento futuro utile nella rigenerazione neuronale.

I nanomateriali a base di carbonio sono costituiti da diverse strutture tra cui fullerene e carbon dots (proprietà uniche di fluorescenza, biocompatibili, solubili in acqua ed economici), nanotubi di carbonio adimensionali (CNT), grafene bidimensionale e nanodiamanti. Le differenti strutture possiedono caratteristiche distinte e vengono sfruttate come vettori per la somministrazione di farmaci al cervello. Sono necessari ulteriori studi per identificarne le nuove proprietà e attività delle diverse strutture.

Il rilascio del farmaco al cervello utilizzando nanostrutture a base di carbonio è il metodo che ha suscitato maggiore interesse recentemente. Piccole nanostrutture a base di carbonio consentono la penetrazione della barriera ematoencefalica e la funzionalizzazione della superficie. Consentono anche un facile caricamento di molecole, e quindi possono essere utilizzati per fornire farmaci al cervello; modalità di rilascio molto utile per il trattamento di tumori al cervello e per disturbi neurodegenerativi. La Figura 2.4 mostra una presentazione schematica dell'applicazione di nanostrutture di carbonio nella somministrazione di farmaci al cervello per disturbi neurodegenerativi.

⁹La trasmissione del segnale avviene con due modalità: un sistema complesso di neurotrasmettitori e recettori che trasmettono i segnali attraverso la sinapsi da un neurone al successivo, e un sistema formato dai canali del sodio controllati dal voltaggio e da poche altre molecole che trasmette il segnale lungo gli assoni (la parte allungata dei neuroni).

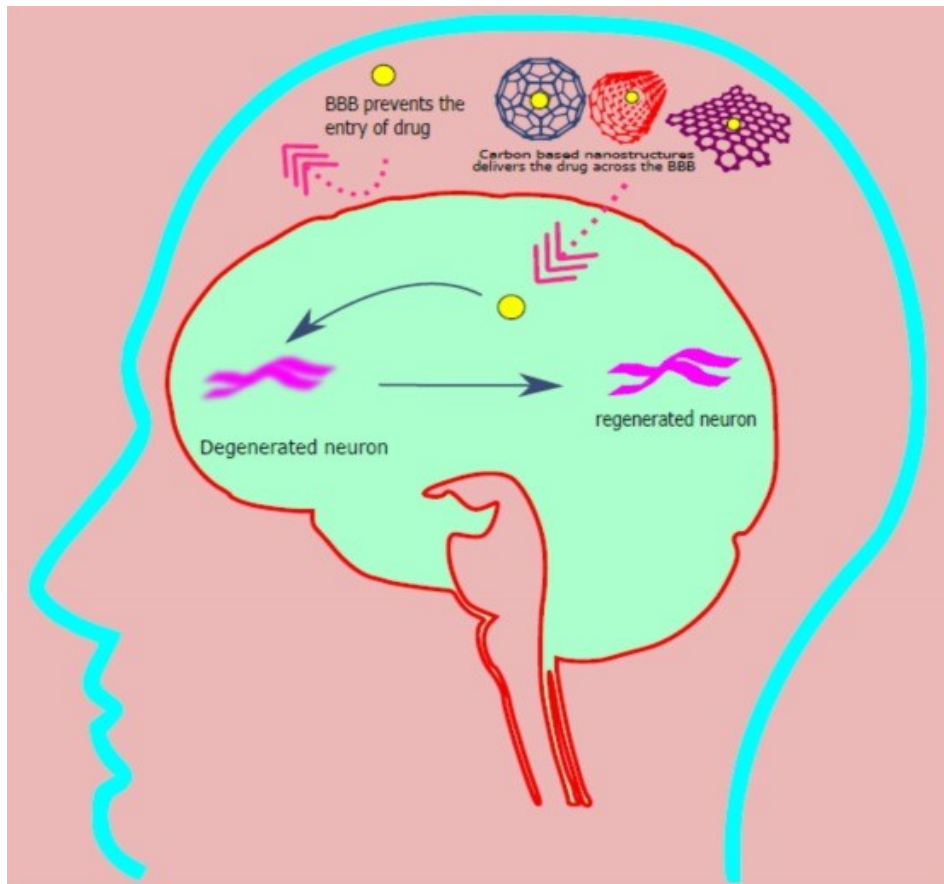


Figura 2.4 Applicazione di nanostrutture a base di carbonio per disturbi neurodegenerativi mediante il trasporto di farmaci al cervello.

I nanotubi di carbonio sono strutture tubolari con un elevato potere di penetrazione e ampia superficie e inoltre possono essere coniugate alla loro superficie molte molecole. Tutte queste proprietà rendono i nanotubi di carbonio dei candidati ideali per la somministrazione di farmaci al cervello.

Il grafene è costituito da uno strato di atomi di carbonio disposti in un reticolo esagonale a nido d'ape; in particolare, i nanomateriali della famiglia del grafene sono stati identificati come nuovi biomateriali per diverse applicazioni biomediche come i nanocarrier, i biosensori e la rigenerazione neurale delle cellule eccitabili. Per migliorare l'adesione cellula-substrato, il grafene deve essere rivestito con uno strato di prerivestimento come laminina, collagene, matrigel e poli-L-lisina. Li e colleghi [29] hanno utilizzato grafene rivestito con poli-L-lisina in un modello di coltura ippocampale e hanno scoperto che lo scaffold induceva la sovraregolazione della proteina 43 associata alla crescita dei neuriti.

Il Grafene ha una varietà di derivati come l'ossido di grafene, l'ossido di grafene ridotto (rGO), nanostrisce¹⁰ di ossido di grafene, quantum dots (piccoli cristalli di dimensioni nanometriche formati da materiali semiconduttori) di grafene. Ognuno di questi svolge diverse attività nel cervello e nei neuroni. Proprietà come la maggiore superficie, la disponibilità di elettroni π liberi e la loro purezza, li rendono candidati ideali per il trasporto di farmaci.

La natura non tossica e le proprietà superficiali dei nanodiamanti sono in grado di fornire una somministrazione mirata di farmaci efficace e selettiva. Essi hanno caratteristiche specifiche come la dimensione delle particelle, la morfologia, la distribuzione e la reattività. Queste caratteristiche sono importanti in previsione delle proprietà biologiche. Negli aggregati di nanodiamanti la molecola di farmaco rimane intrappolata all'interno del nanoporo e fornisce una forte interazione farmaco-nanodiamante; inoltre la superficie dei nanodiamanti può essere funzionalizzata per diverse molecole mediante legame covalente o legame non covalente. I composti possono essere poi assorbiti su di esso per fornire il farmaco al sito bersaglio.

La natura idrofobica del carbonio favorisce alcuni aspetti della somministrazione di farmaci come una maggiore permeazione attraverso le membrane biologiche, da cui dipende la capacità di attraversare la barriera ematoencefalica.

La principale limitazione delle nanostrutture di carbonio nel loro utilizzo per applicazioni di somministrazione di farmaci è l'idrofobicità. La funzionalizzazione della superficie è ampiamente utilizzata per l'ottimizzazione delle proprietà delle nanostrutture di carbonio per le applicazioni desiderate. Ciò potrebbe persino ridurre la loro tossicità e migliorare la biocompatibilità.

Il ruolo di maggiore interesse delle nanostrutture a base di carbonio è quello nella neuro-rigenerazione e nella crescita dei neuriti.

Alcune nanostrutture di carbonio hanno inoltre mostrato un'azione anti-amiloide come i punti quantici di fullerene e grafene, che possono essere un punto di partenza nella medicina per i disturbi di aggregazione dell'amiloide come per l'Alzheimer.

In breve, diverse nanostrutture a base di carbonio hanno attività neurogenerative e quindi risultano utili nel trattamento di malattie come il morbo di Alzheimer e il morbo di Parkinson. La Figura 2.5 rappresenta le attività di alcune nanostrutture a base di carbonio nell'Alzheimer e nel Parkinson. Sono stati inoltre condotti studi di biocompatibilità e tossicità in vivo e in vitro delle nanostrutture di carbonio per valutarne la sicurezza in un sistema biologico [1][23].

¹⁰ Nastro di grafene con spessore inferiore ai 50 nm.

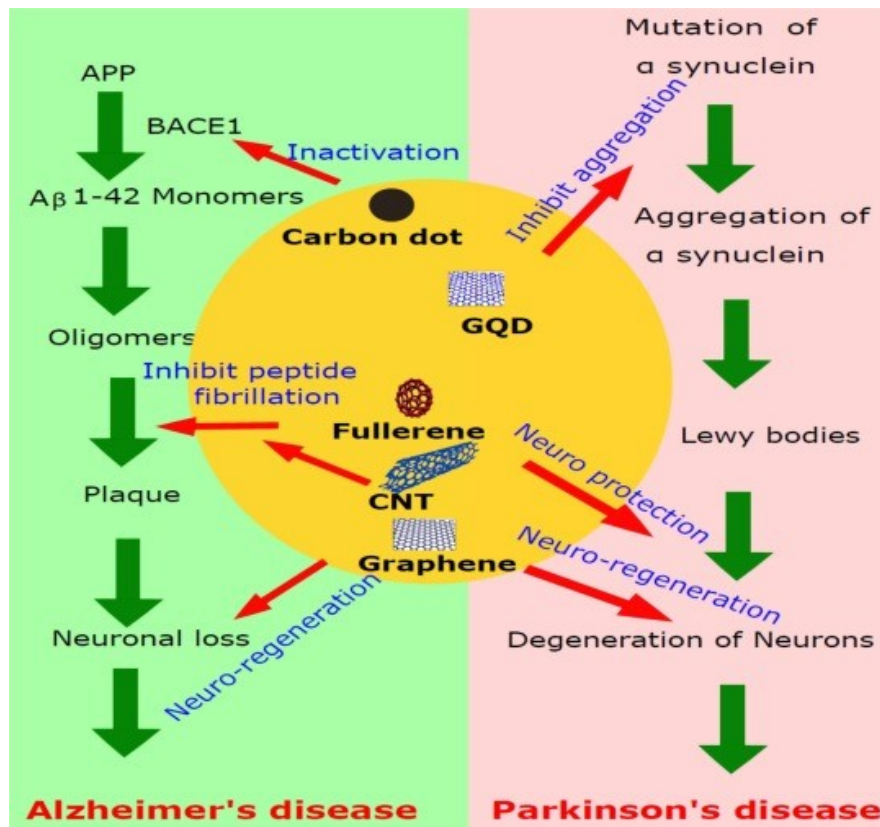


Figura 2.5 Attività di diverse nanostrutture a base di carbonio per il morbo di Alzheimer e Parkinson.

2.6 Caratteristiche dei materiali polimerici utilizzati nell'ingegneria tissutale neurale

La matrice extracellulare svolge numerose funzioni nel corpo, come il supporto strutturale e meccanico ai tessuti, tiene insieme le cellule, ne facilita la migrazione e la reciproca comunicazione. Alcuni biomateriali polimerici replicano similmente le macromolecole con cui le cellule interagiranno in vivo. In seguito si riportano le caratteristiche di alcuni biomateriali polimerici utilizzati per l'ingegneria tissutale neuronale [20].

2.6.1 Materiali polimerici naturali per l'ingegneria dei tessuti neurali.

I polimeri naturali sono molto simili alle sostanze macromolecolari applicate nell'ingegneria tissutale neurale. Alcuni in particolare, come vedremo di seguito, sono stati maggiormente efficaci nell'applicazione nella rigenerazione neuronali.

2.6.1.1 Collagene

Il collagene è un biomateriale utilizzato per formare idrogel a base naturale, molto usato per la sua bassa antigenicità, eccellente biocompatibilità e biodegradabilità, per la sua capacità di trasporto di fattori neurotrofici, la capacità di favorire la migrazione cellulare e di dirigere la crescita degli assoni lungo i suoi canali ordinati (aptotassi).

Oltre alle sue qualità naturali, il collagene è già presente in diverse applicazioni mediche come nella rigenerazione ossea e cartilaginea, nell'ingegneria tissutale, nel trasporto genico e di farmaci e nei sistemi di incapsulamento cellulare.

Il collagene è ampiamente studiato per l'ingegneria tissutale neurale e solo poche persone possiedono un'immunità umorale, che è parte della risposta immunitaria, contro di esso. Roditori, bovini e umani sono le principali fonti di collagene.

Il collagene può essere utilizzato in diverse forme, in base alle diverse necessità di utilizzo: da film a spugne, gel o nanoparticelle. Con la variazione del pH della soluzione di collagene, la formazione di gel viene utilizzata come potenziale metodo di produzione di scaffold. Le diverse concentrazioni di collagene possono far variare la qualità dello scaffold. Recenti studi [68] hanno dimostrato che il collagene, avendo proprietà fisiche e meccaniche simili al tessuto nervoso, è un polimero naturale adatto per la rigenerazione nervosa.

I CollScaff (collagen scaffolds) sono generati facilmente e rapidamente utilizzando diversi crosslinker, o reticolanti, chimici come glutaraldeide, formaldeide o polietilenglicole (PEG), così come grazie a trattamenti fisici con calore secco e irradiazione ultravioletta.

I CollScaff possono essere caricati in modo efficiente con sostanze terapeuticamente attive che vengono rilasciate insieme alla degradazione del collagene. Inoltre, questi CollScaff possono essere modificati per avere le proprietà desiderate come termoresistenza, risposta al pH e aumento o diminuzione del tasso di rilascio di farmaci a seconda del grado di reticolazione. Uno dei principali vantaggi degli CollScaff è che sono iniettabili, e questo fornisce un'applicazione diretta in situ piuttosto che mediante somministrazione sistemica.

Poiché la biodisponibilità di molti farmaci al cervello è fortemente limitata dalla barriera ematoencefalica, lo scaffold di collagene iniettabile può essere un metodo di somministrazione minimamente invasivo che fornisce un rilascio locale, controllato e prolungato dei farmaci con effetti collaterali sistemici minori. Oltre alle difficoltà di passaggio attraverso la BBB, la maggior parte delle molecole terapeutiche sono instabili nel corpo e si degradano rapidamente prima di raggiungere il loro obiettivo. L'applicazione di queste sostanze all'interno di CollScaff impedirà la rapida degradazione dei farmaci prima che raggiungano il cervello. CollScaff può anche essere utilizzato come sistema di rilascio cellulare incapsulando cellule staminali progenitrici che andranno a differenziarsi nella tipologia di cellula desiderata oppure possono agire come fonti localizzate di fattori di crescita per promuovere la protezione endogena e la capacità di riparazione del sistema nervoso centrale. L'incapsulamento delle cellule in una matrice fornisce l'immobilizzazione delle cellule trapiantate e crea un microambiente ottimale

per le cellule e ne prolunga la sopravvivenza all'interno del tessuto. Inoltre, questo metodo previene la formazione di tumori causati dalla crescita incontrollata delle cellule trapiantate. In Figura 2.6 sono riportate alcune strategie terapeutiche per l'applicazione di scaffold di collagene nel morbo di Alzheimer e Parkinson.

Gli scaffold di collagene vengono preparati mescolando quest'ultimo con un reticolante e caricando una molecola (di 0,5-1,5 mm) o una cellula di interesse. Le microsferi di collagene sono molto più piccole (1-5 µm) ma più complesse da preparare.

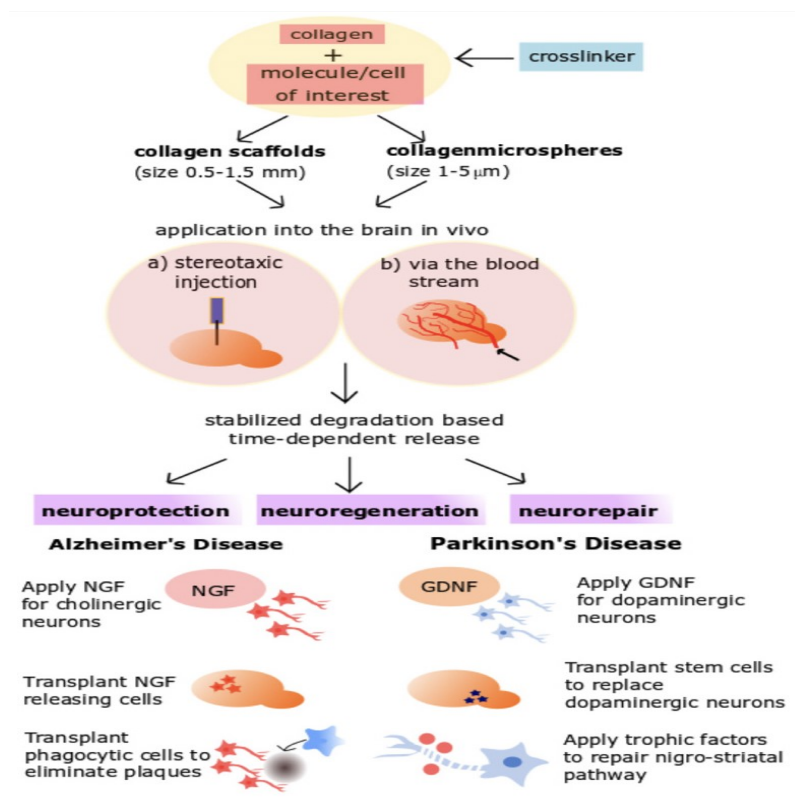


Figura 2.6 Strategie terapeutiche per applicare scaffold di collagene nel morbo di Alzheimer e Parkinson.

Nel cervello il rilascio della molecola basato sulla degradazione nel tempo può portare neuroprotezione, neuroriparazione o neurorigenerazione. In alternativa possono essere applicate cellule stabilizzate con collagene. Di grande importanza è l'applicazione di scaffold di rilascio del fattore di crescita nervoso (NGF) o il trapianto di cellule di rilascio di NGF per proteggere i neuroni colinergici nel morbo di Alzheimer oppure il trapianto di cellule fagocitarie per eliminare le placche di amiloide-beta. D'altra parte, nel morbo di Parkinson l'applicazione del fattore neurotrofico delle cellule derivate dalla linea gliale (GDNF) può proteggere i neuroni dopaminergici.

Riassumendo, le microsfele di collagene e CollScaff caricati con fattori terapeutici hanno un grande potenziale nel trattamento di determinate condizioni neurodegenerative e di alcuni disturbi del sistema nervoso come ictus e lesioni cerebrali. Questo metodo di somministrazione del farmaco può essere utilizzato per l'applicazione di più farmaci, come combinazioni di fattori di crescita e sostanze antiossidanti contro la neurodegenerazione. Inoltre, le nanosfele di collagene modificate in superficie possono essere somministrate sistemicamente e utilizzate per colpire il cervello senza una grave chirurgia stereotassica ¹¹invasiva. È certo che, nonostante le ottime proprietà naturali del collagene, gli effetti collaterali di questi sistemi come l'eventuale gliosi¹² devono essere considerati e valutati attentamente nelle sperimentazioni precliniche prima di entrare nelle sperimentazioni cliniche. Tuttavia, il collagene come biomateriale naturale presenta notevoli vantaggi sia in termini di riparazione che di rigenerazione del sistema nervoso centrale [10][20].

2.6.1.2 Acido ialuronico (HA)

L'acido ialuronico è un glicosaminoglicano lineare avente alcuni siti per l'adesione cellulare ed è un candidato ideale per la rigenerazione dei tessuti del sistema nervoso centrale data la sua naturale presenza nella matrice extracellulare cerebrale. La presenza di acido ialuronico ha notevolmente ridotto la formazione di cicatrici gliali dopo l'impianto, il che lo rende interessante nella fabbricazione di scaffold [20].

2.6.1.3 Derivati dell'acido ialuronico

Lo svantaggio principale dell'HA è la scarsa aderenza alla sua superficie. Pertanto, per favorire la sua adesione cellulare, vengono realizzati composti di HA con altri materiali. La miscela di HA e collagene ha prodotto scaffold con proprietà meccaniche favorevoli per la rigenerazione del sistema nervoso centrale. La proposta migliore per l'ingegneria tissutale neurale è data dal derivato di acido ialuronico prodotto dall'esterificazione di HA con alcol benzilico. Questo composto può essere prodotto sotto forma di una varietà di dispositivi come garze, scaffold biocompatibili in tessuto non tessuto, tubi e membrane [20].

¹¹ Tecnica neurochirurgica che si avvale di dispositivi stereotassici ad altissima definizione geometrico-spaziale, in grado di localizzare con precisione un bersaglio situato nelle parti profonde e meno accessibili del cervello.

¹² La gliosi è un processo di proliferazione di astrociti in aree danneggiate del sistema nervoso centrale, che porta in genere alla formazione di una cicatrice gliale.

2.6.1.4 Chitina e chitosano

Chitina e chitosano sono i polisaccaridi più abbondanti presenti in natura. Determinati studi [69] hanno dimostrato che chitina e chitosano sono entrambi adatti per l'adesione delle cellule nervose, per la crescita di neuriti, e per le guide neurali ¹³ biodegradabili. Tubi nanofibrosi di chitina e chitosano impiantati nel nervo sciatico di roditore hanno portato alla proliferazione di cellule staminali neurali. La combinazione di chitosano estruso, agarosio e alginato, ha prodotto un bioink seminato con cellule staminali neurali umane corticali anteriori e dopo tre settimane è stata osservata la presenza di neuroni maturi nell'analisi immunohistochimica [70][6][20].

2.6.2 Materiali polimerici sintetici

La produzione di scaffold sintetici biocompatibili, biodegradabili, conduttivi e resistenti con una varietà di caratteristiche meccaniche e di velocità di degradazione è molto interessante per la crescita di neuriti. Questi scaffold imitano esattamente le caratteristiche biologiche e meccaniche della matrice extracellulare e delle cellule in vivo e vengono comunemente applicati per le lesioni dei nervi periferici e centrali, sia in vivo che in vitro. Di seguito sono riportati i dettagli di alcuni polimeri sintetici ampiamente utilizzati per la fabbricazione di scaffold [20].

2.6.2.1 Acido poli L-lattico (PLLA)

Il PLLA è un biomateriale sintetico biocompatibile utilizzato in varie applicazioni biomediche. Gli scaffold di PLLA nanostrutturati hanno alcune analogie con le matrici extracellulari naturali come l'elevata porosità, la variabile distribuzione della dimensione dei pori, e l'elevato rapporto superficie/volume. Recenti studi hanno dimostrato che gli scaffold di PLLA promuovono efficientemente la crescita di neuriti e la differenziazione del sistema nervoso centrale. Questo li rende adatti per l'ingegneria tissutale neurale [20].

2.6.2.2 Acido poli-D, L-lattico-co-glicolico (PLGA)

Il copolimero dell'acido polilattico co-glicolico è la formulazione di PLA e PGA. Il PLGA è stato ampiamente utilizzato come scaffold biodegradabile nelle applicazioni biomediche e nell'ingegneria tissutale neurale. Essendo idrofilici hanno mostrato risultati promettenti nelle medicazioni di lesioni, nella riparazione ossea e nell'ingegneria tissutale. Tuttavia, a causa della mancanza di adesione cellulare, molte tecniche come la miscelazione, l'attaccamento covalente

¹³ condotti cilindrici utilizzati per la riparazione dei nervi periferici.

di peptidi adesivi, l'idrolisi e l'aminolisi, sono state sviluppate per modificare l'adesione cellulare e lo scaffold di PLGA.

Le nanoparticelle di PLGA caricate con galantamina hanno mostrato un'elevata efficienza di incapsulamento e un rilascio prolungato del farmaco, mantenendo l'attività farmacologica della galantamina utilizzando la nanoemulsione per la somministrazione endovenosa nel morbo di Alzheimer [20].

Capitolo 3. Utilizzo dei biomateriali per il morbo di Alzheimer e il morbo di Parkinson

3.1 Studi condotti sul morbo di Alzheimer

Sono stati testati composti terapeutici per il trattamento del morbo di Alzheimer in grado di attraversare la barriera ematoencefalica e che quindi non hanno necessariamente bisogno di un sistema di rilascio di biomateriali. Essi includono il neurosteroido allopregnanolone [33], l'inibitore dei mastociti masitinib [34] e il mimetico Exendin-4 del peptide-1 simile al glucagone [35]. Tuttavia gli studi sulla nanotecnologia sono importanti in quanto potrebbero ottenere le risposte desiderate in maniera più selettiva, con tempi migliori e con minori effetti collaterali rispetto agli approcci farmacologici convenzionali. Queste applicazioni di biomateriali potrebbero portare, oltre che al rallentamento della progressione della malattia, anche alla riparazione o alla rigenerazione dei tessuti danneggiati del sistema nervoso centrale. In Tabella 3.1 sono indicati i diversi agenti terapeutici e il relativo stato di studio [30-31].

TABLE 1 | Therapeutic agents mentioned in this article: current status, way of administration, and therapeutic effect.

Agent, section	Status	Administration	Effect
Rivastigmine, Current Treatment	FDA approved	Oral, plaster	Selective pseudo-irreversible inhibition of acetylcholinesterase
Galantamine, Current Treatment	FDA approved	Oral	Selective reversible inhibition of acetylcholinesterase
Tacrine, Current Treatment	FDA approved	Oral	Non-selective reversible inhibition of acetylcholinesterase
Donepezil, Current Treatment	FDA approved	Oral	Selective reversible inhibition of acetylcholinesterase
Memantine, Current Treatment	FDA approved	Oral	Non-competitive inhibition of the N-methyl-D-aspartate receptor
Allopregnanolone, Current Treatment	Clinical trial	Oral	Increased expression of brain LXR and PXR receptors
Masitinib, Current Treatment	Clinical trial	Oral	Inhibition of mast cells and tyrosine kinase fyn
Exendin-4, Current Treatment	Clinical trial	Oral	Mimetic of glucagon-like peptide-1, acts as neuronal growth factor
Insulin, Current Treatment	Clinical trial	Intranasal	Stimulation of cellular glucose uptake, growth factor-like properties
Mesenchymal stem cell, Current Treatment	Clinical trial	Intravenous or intracerebral injection of cell suspensions	Secretion of neurotrophic factors, differentiation to neuronal cells
IGF, Growth Factor-Loaded Polymeric Nanoparticles	Animal model	Intravenous or intranasal injection of NPs	Growth factor signaling
NGF, Growth Factor-Loaded Polymeric Nanoparticles	Animal model	Intravenous or intranasal injection of NPs	Growth factor signaling
bFGF, Growth Factor-Loaded Polymeric Nanoparticles	Animal model	Intravenous or intranasal injection of NPs	Growth factor signaling
Deferiprone, Nanoparticle Chelators	<i>In vitro</i> model	Addition of NPs	Inhibition or reverse of A β aggregation by chelation of metal ions
D-penicillamine, Nanoparticle Chelators	<i>In vitro</i> model	Addition of NPs	Inhibition or reverse of A β aggregation by chelation of metal ions
Cloquinal, Nanoparticle Chelators	Animal model, clinical trial	Oral	Inhibition or reverse of A β aggregation by chelation of metal ions
Polyoxometalate/ β -sheet breaker peptide, Gold Nanoparticles	Animal model	Intravenous injection of NPs	Inhibition or reverse of A β aggregation by chelation of metal ions
Docosahexaenoic acid, Liposomes	<i>In vitro</i> model	Addition of gold NPs	Inhibition or reverse of A β aggregation by interfering with A β
Curcumin, Liposomal Encapsulation of Natural Components	<i>In vitro</i> model	Addition of liposomes	Induction of non-amyloidogenic processing of APP
Quercetin, Liposomal Encapsulation of Natural Components	<i>In vitro</i> model	Addition of liposomes	Targeting of liposomes to A β fibrils
A β peptides, Liposomal Vaccines	Animal model	Oral, intranasal injection of liposomes	Reduction of oxidative stress
Rivastigmine, Drug-Loaded Liposomes	Animal model	Intraperitoneal injection of liposomes	Immune response to A β peptides
BDNF, Neurotrophic Factor-Loaded Liposomes	Animal model	Intraperitoneal or intranasal injection of liposomes	Increased acetylcholine esterase inhibition and longer time of action
Donepezil, Microparticles	Animal model	Intravenous, -peritoneal, or -nasal injection of liposomes	Growth factor signaling
Neural stem cell, Biomaterials for Cell Transplantation	Animal model	Subcutaneous implantation of microparticles	Selective reversible inhibition of acetylcholinesterase
	Animal model	Intracerebral injection of cell suspension and self-assembling peptide scaffold	Secretion of neurotrophic factors, differentiation to neuronal cells

Tabella 3.1 Agenti terapeutici studiati o in fase di studio per il morbo di Alzheimer.

3.1.1 Hydrogel nel morbo di Alzheimer

Nel morbo di Alzheimer gli studi si sono concentrati principalmente sulla somministrazione di farmaci. Sono stati studiati idrogel peptidi-anfifilici per il rilascio del composto antiossidante e neuroprotettivo curcumina (principio attivo della curcuma che sembrerebbe diminuire l'accumulo di β -amiloide e migliorare l'umore), e idrogel a base di gomma di gellano e gomma di xantano per il rilascio di resveratrolo (sostanza prodotta naturalmente da particolari piante, che sembrerebbe rallentare la progressione della malattia). L'incapsulamento dei fibroblasti che secernono VEGF (vascular-endothelial growth factor, fattore di crescita che svolge un ruolo importante nell'angiogenesi) in alginato, ha ridotto la deposizione di amiloide- β nei modelli murini APP/PS1. Inoltre, alcuni studi hanno dimostrato che l'incapsulamento delle cellule staminali neurali (NSC) in diversi tipi di idrogel ha migliorato la sopravvivenza delle cellule staminali e le capacità cognitive nei modelli di roditori [1] [30-31].

3.1.2 Nanoparticelle (NP) per il trattamento del morbo di Alzheimer

Lo studio per la cura delle malattie neurodegenerative attraverso nanoparticelle incominciò anni fa. Nello studio del morbo di Alzheimer inibitori di acetilcolinesterasi sono stati caricati in diversi tipi di NP dimostrando, nello studio in vivo in modelli di roditori, un aumento di ricezione del farmaco al cervello. Lo stesso risultato si ottiene caricando la curcumina in questo tipo di nanoparticelle. La somministrazione di nanoparticelle è preferibilmente per via intranasale, in quanto modelli di roditori con AD hanno risposto a questa somministrazione con un miglioramento della memoria e dell'apprendimento.

Le NP sono state utilizzate anche nella terapia di chelazione dei metalli, che utilizza composti chelanti dei metalli per ridurre lo stress ossidativo cellulare nell'Alzheimer e con l'obiettivo di invertire o prevenire l'aggregazione di A β . È stato dimostrato che l'uso di NP caricate con composti chelanti ha migliorato la somministrazione di farmaci con benefici sia in vitro che in vivo.

In un modello in vitro che utilizzava neuroni corticali umani in coltura [69], la somministrazione di NP di polistirene di 240 nm coniugati in modo covalente con un chelante del deferiprone, ha comportato una diminuzione della citotossicità del peptide A β dovuta alla prevenzione dell'aggregazione di A β . Ciò suggerisce che l'uso di composti chelanti metallici potrebbe essere un approccio utile nel trattamento o nella prevenzione dell'AD. Tuttavia, l'applicazione di tali agenti è limitata a causa degli effetti collaterali tossici e della bassa biodisponibilità dovuta al basso potenziale di penetrazione dei chelanti attraverso la BBB. Entrambe le limitazioni possono essere migliorate coniugando i composti chelanti metallici ai

nanocarrier (nanoparticelle per il trasporto di agenti terapeutici o sostanze in siti specifici). È stato dimostrato che le NP di polistirene chelante sono state correttamente assorbite dal tessuto cerebrale in vitro senza alterazione della capacità di chelazione dei metalli.

In uno studio in vitro, il chelante Cu (I) d-penicillamina è stato accoppiato in modo covalente da un legame disolfuro a NP lipidiche costituite da esadecanolo e 1,2-dioleoyl-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[3-(2-piridilditio)-propionato]. La precipitazione di A β indotta dal metallo è stata invertita dalla d-penicillamina rilasciata dalle NP dal ditiotreitolo (come modello per il glutatione cellulare), con conseguente formazione di depositi solubili [36].

Un altro metallo chelante è il derivato della chinolina cliochinolo (5-cloro-7-iodo-8-idrossichinolina) (CQ), che ha affinità per lo Zn e il Cu. Il trattamento di topi transgenici aventi AD con CQ ha inibito l'aggregazione A β indotta dai metalli. Uno studio clinico pilota di fase 2 ha mostrato la capacità del CQ somministrato per via orale di rallentare il declino cognitivo [37]. Al fine di aumentare la biodisponibilità del CQ nel cervello, il chelante è stato incapsulato in nanoparticelle PBCA (poli(butilcianoacrilato)) da 40 nm, che sono state rivestite con polisorbato 80. È stato scoperto che queste CQ-NP attraversano in modo efficiente la BBB nei topi wild-type (gene che esprime il fenotipo naturale, non mutato. Il fenotipo wild-type è quello più frequente in una popolazione naturale) e quindi hanno un grande potenziale per il trattamento dell'AD [38].

Come descritto, la distruzione delle fibrille e delle placche A β sono importanti nello studio per il trattamento dell'AD. Ciò potrebbe essere ottenuto anche mediante l'uso di nanoparticelle d'oro; questo perché l'interazione delle NP d'oro con le fibrille A β e la successiva esposizione a deboli campi di microonde (un campo a microonde viene utilizzato per accelerare particelle cariche) provoca un aumento locale della temperatura e la dissoluzione delle fibrille. Studi in vivo sui topi hanno dimostrato che il trattamento con NP d'oro ha il potenziale per rallentare o fermare la progressione dell'AD, senza causare effetti dannosi per il cervello [68]. In uno studio recente sono state utilizzate nuove NP d'oro coniugate con due composti che interferiscono con le fibrille A β . Queste NP in oro multifunzionali da 22 nm sono state in grado di ridurre la citotossicità delle fibrille A β e l'attività della perossidasi mediata da A β in vitro [39]. Pertanto, questi risultati indicano che le NP multifunzionali inorganiche hanno un buon potenziale nel trattamento dell'AD. Tuttavia, nonostante il chelante sia attivo dopo essere stato coniugato con composti che interferiscono con le fibrille di A β (successivamente aggiunte ai neuroni in coltura e tessuto cerebrale in vitro), questo trattamento solleva dei punti interrogativi sulla somministrazione in vivo di queste nanoparticelle non degradabili [1] [30-31].

3.1.3 SAPs per trattare il morbo di Alzheimer

Yu et al. hanno utilizzato polimeri modificati con lattoferrina per fornire il peptide neuroprotettivo umanina in un modello di topo con Alzheimer, mostrando un migliore rilascio di farmaci grazie a questa tipologia di peptidi [61]. Più recentemente, i peptidi autoassemblanti in foglietti β sono stati studiati come nanopiattaforma per la vaccinazione. Questi gruppi sono stabili, resistenti alla proteolisi (processo di degradazione delle proteine da parte dell'organismo) e possono trasportare numerosi determinanti antigenici per suscitare una risposta immunitaria più forte [62]. Per consentire la crescita e la differenziazione delle cellule staminali all'interno dei biomateriali, è importante creare un ambiente simile all'ECM. Insieme ad altri peptidi che sono stati studiati per lo sviluppo di un biomateriale simile all'ECM, gli amiloidi sembrano essere peptidi promettenti per il controllo del comportamento delle cellule staminali. Infatti, la loro formazione a partire da proteine solubili è associata a numerose malattie degenerative. Jacob e colleghi hanno sviluppato nanofibrille amiloidi, composte da peptidi protetti da Fmoc (fluorenil metilossicarbonil) derivati da A β 42 C-terminale per creare un idrogel per lo sviluppo delle cellule staminali. Questo idrogel consente la proliferazione e l'adesione delle cellule e supporta la differenziazione delle cellule neuronali mesenchimali [63]. È stato anche dimostrato che il peptide β -amiloide (A β) stimola la neurogenesi [64-65].

Mehrban e colleghi hanno dimostrato che le fibre autoassemblanti (SAF) basate su peptidi ad alfa elica sono state in grado di creare un ambiente che consente non solo l'adesione delle cellule staminali neuronali, ma anche la loro differenziazione in neuroni [66]. La combinazione di cellule staminali con SAF potrebbe consentire la coltura di cellule in un ambiente in vitro morfologicamente simile a quello trovato in vivo. La possibilità di ottenere SAF tessuto-specifiche date da sequenze peptidiche specifiche, consente la differenziazione delle cellule in una linea specifica. Ciò è importante non solo per il trapianto cellulare nella neurodegenerazione, ma anche per un buon 'disease modeling' [67].

Interessanti sono anche le nanoparticelle lipidiche studiate per veicolare un vaccino contro peptidi A β aggregati e contro conformatori delle proteine tau fosforilate, ottenendo risultati positivi.

Sebbene siano stati pubblicati molti studi in vitro e preclinici volti a inibire o invertire il progresso dell'AD, gli attuali trattamenti clinici si basano ancora sul contrasto dei sintomi della malattia. Approvate o in fase sperimentale, tuttavia, tutte le strategie di trattamento possono trarre vantaggio dall'utilizzo di biomateriali. Questi sono per lo più sotto forma di particelle, di dimensioni nano o micro, che possono proteggere il carico terapeutico dopo la somministrazione. Inoltre, le particelle di biomateriale possono facilitare il trasporto dei

composti terapeutici attraverso la BBB e indirizzarli a siti patologici nel cervello. Oltre ai farmaci, i componenti attivi possono essere anche cellule per la rigenerazione del tessuto cerebrale. In questo caso, viene utilizzato uno scaffold di biomateriali per guidare e proteggere le cellule. Si conclude che vi è un ruolo sempre più importante per i biomateriali nel trattamento dell'AD [1] [30-31].

3.2 Studi condotti sul morbo di Parkinson

Come si è visto in precedenza, il morbo di Parkinson è caratterizzato dalla distruzione dei neuroni dopaminergici nella substantia nigra, che portano ai sintomi caratterizzanti la malattia come i tremori o la bradicinesia. Un altro segno patologico del morbo è il deposito dei corpi di Lewy, composti di α -sinucleina e di un monomero di ubiquitina. Il traffico vescicolare e la degradazione, così come anche possibili mutazioni genetiche, portano all'accumulo di α -sinucleina in monomeri o aggregati.

Nella Tabella 3.2 sono elencati alcuni biomateriali nello studio del morbo di Parkinson.

Nanocarrier	Encapsulated drug/genes	Model	Salient features	References
PLGA	Ropinirole (RP) (8 mg RP + 50 mg PLGA 502) Route: IP	Zebrafish: FRET experiments Male C57BL/6 mice (MPTP: 18 mg/kg prepared in 0.9% saline) Male Wistar rats (neurotoxin rotenone: 2 mg/kg)	<ul style="list-style-type: none"> FRET analysis supported caveolae-mediated endocytosis of nanoparticle Significant increase in bioavailability Encapsulation efficiency for 8 mg RP: $74.8 \pm 8.2\%$ Reported burst drug release of 20% after 24 h and slower release for 5 days RP encapsulated NPs improved performance in akinesia, catalepsy, rotarod and swim test 	Barcia et al. (2017)
Poly(butyl-cyanoacrylate) nanoparticles	Dopamine	Male Wistar rats (6-OHDA solution: 4 mg/mL in 1% ascorbic acid)	<ul style="list-style-type: none"> Reported burst drug release after 2 h and sustained release for 48-72 h Reversed neurobehavioral deficits in Parkinsonian rats 	Jahansooz et al. (2020)
Polymeric micelles and thermosensitive hydrogels	Rotigotine (Dopamine agonist)	Sprague Dawley (SD) rats New Zealand white rabbits	<ul style="list-style-type: none"> Encapsulation efficiency 93.5 ± 0.75 Release of Rotigotine from polymeric micelles & thermosensitive hydrogel was 75.1% and 52.9% within 48 h Bioavailability of Rotigotine from polymeric micelles & thermosensitive hydrogel was 84.6% <i>in vivo</i> intra-nasal administration 	Wang et al. (2020)
Quaternized chitosan, gelatin, and dopamine hydrogel	Dopamine and metronidazole	L929 cells: <i>In vitro</i> biocompatibility study	<ul style="list-style-type: none"> Sustained release of dopamine and inflammatory drugs The hydrogels degraded completely between 400 h and 1100 h Hydrogel has no toxicity on L929 cells The long-term and sustained drug release system 	Ren et al. (2017)
RVG29 functionalized Liposomes	N-3,4-bis(pivaloyloxy)-dopamine (BPD)	<i>In vitro</i> assessments: <ul style="list-style-type: none"> bEnd.3 SH-SY5Y Neuro-2a Hela cell lines <i>In vivo</i> assessments: <ul style="list-style-type: none"> Kunming mice Nude mice Sprague-Dawley rats (6-OHDA + 0.9% saline) 	<ul style="list-style-type: none"> Encapsulation efficiency BPD-PEG-lip: $55.30 \pm 2.3\%$ Encapsulation efficiency BPD-RVG29-lip: $52.52 \pm 1.6\%$ 80% of drugs released within 8 h incubation RVG29 acts as a dual-targeted ligand RVG29-lip shows more accumulation in bEnd.3 and SH-SY5Y cells and cross the BBB and reach striatum and nigra Limited distributions to peripheral organs 	Qu et al. (2018a)
Thiolated OX26 Mab conjugated PEGylated liposomes (PLs)	Dopamine	Male Wistar rats (Transection of the medial forebrain bundle (MFB))	<ul style="list-style-type: none"> Encapsulation efficiency: 34% Higher residence time with improved pharmacokinetic properties Limitation of the study: MFB does not induce selective loss of DA fibers and nigrostriatal pathway 	Kang et al. (2016)

Liposome	Resveratrol (20 mg/kg per day)	Male Wistar rats (6-OHDA solution: 45 mg/mL in 0.5 w% ascorbic acid)	<ul style="list-style-type: none"> Abnormal behaviour in PD rats improved with increased survival of nigral and dopaminergic neurons Apoptotic nigral cells were reduced Reduction of total ROS and a significant increase in T-AOC indicating anti-oxidative effects of the drug
Multifunctional poly (amidoamine) (PAA) crosslinked NIPAM thermosensitive hydrogel	Activin B	<i>In vitro</i> assessments: SH-SY5Y cells (40 μ M MPP ⁺ for 24 h) <i>In vivo</i> assessments: Male C57BL/6J mice (MPTP: 30 mg/kg)	<ul style="list-style-type: none"> Sustained release of activin B for 5 weeks Release kinetics of activin B was 53.7% by day 15 Behavioral improvement and enhanced biotolerance Enhanced density of tyrosine hydroxylase positive (TH⁺) nerve fibers with reducing inflammatory responses and cell apoptosis
Nanocomposite micelles (chitosan polyethyleneglycol-poly lactic acid (mPEG-PLA))	Acteoside pDNA NGFR	MPP induced PD model in PC12 cells MPTP induced PD model in female C57 mice	<ul style="list-style-type: none"> Size of the nanocomposite micelles 160 nm and the drug loading rates for pDNA (0.49%), NGF (0.73%), and ACT (6.64%) Nanomicelles attenuates neurotoxicity induced by MPP in PC12 cells and inhibits the α-synuclein aggregation NGFR levels were significantly increased in the treatment group Reduces the neurodegeneration in PD mice and reverses the cognitive and locomotor activity
PEGylated liposomes-coupled microbubbles	Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) plasmid	Sprague-Dawley rats (6-OHDA (5 μ g/per rat) in 2 μ L saline with 0.2% (w/v) ascorbic acid)	<ul style="list-style-type: none"> mRNA expression, GDNF, and Nurr1 protein expression increased Apomorphine-induced rotational behaviour reduced Increased suspension and climbing pole test scores
PLGA	Puerarin (5 mg/kg) Route: Oral		<ul style="list-style-type: none"> Encapsulation efficiency for 8 mg RP: 79.52 \pm 1.74%

Table 1 (continued)

Nanocarrier	Encapsulated drug/genes	Model	Salient features	References
Lactoferrin (Lf) modified PEG-PLGA	Rotigotine Route: Intranasal	<i>In vitro</i> assessments: 16HBE and SH-SY5Y cells <i>In vivo</i> assessments: Male Kunming (KM) mice	<ul style="list-style-type: none"> CM from COLL/PEG2000 embedded cells have a superior neuroprotective effect and mitigates oxidative stress Exhibited small spherical shape with negative potential The encapsulation efficiency of optimized formulation: 92.57% \pm 9.41% Higher cellular uptake and relatively lower cell toxicity Higher signal intensity from the Lf-NPs group validates its specificity 	Bi et al. (2016)
Lactoferrin conjugated PEG-PLGA	Urocortin (28 μ g)	<i>In vitro</i> assessments: b.End3 cells <i>In vivo</i> assessments: <ul style="list-style-type: none"> Kunming mice BALB/c Sprague-Dawley rats (6-OHDA solution of 10 μg/ml in 1% ascorbic acid) 	<ul style="list-style-type: none"> Increased uptake of the Lf-NP by bEnd.3 cells Clathrin-mediated endocytosis mechanism for enhanced the uptake of Lf-NP Greater accumulation of Lf-NP in the cortex, substantia nigra, and striatum region Slight transient acute inflammatory reactions in the liver, spleen, and kidney 	Hu et al. (2011)
Leptin bound Liposome	Resveratrol (RES) and Epigallocatechin gallate (EGCG)	SH-SY5Y cells: Neurodegenerative model - Treatment of 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP ⁺) HBMEC cells: BBB	<ul style="list-style-type: none"> An increase in the ratio of DHPD and PA in liposome improved its physio-chemical characteristics Encapsulation efficiency RES: 54.18% Encapsulation efficiency EGCG: 39.52% Increased permeation through BBB and cellular uptake via Lep receptor Improved the survival rate in SH-SY5Y cells from MPP⁺ attack 	Kuo et al. (2021)
Lipid Nanoparticles (SLN and NLC) Enriched Hydrogel	Ropinirole (RP)	Male albino Wistar rats (Haloperidol: 1 mg/kg)	<ul style="list-style-type: none"> Carbopol 934 (gelling polymer) was used to convert RP loaded lipid nanoparticles to hydrogel Significant restoration of lipid peroxides Restoration of induced biochemical changes 	Dudhipala and Gorre (2020)
Liposome	1,9-Pyrazoloanthrone (1,9-P): (JNK-3) inhibitor	<i>In vitro</i> assessments: SH-SY5Y cells <i>In vivo</i> assessments: Wistar rats (6-OHDA + Saline)	<ul style="list-style-type: none"> Encapsulation efficiency: 84.56 \pm 0.25% 1,9-P liposome enabled the survival of cells up to 85.76% at 10 μg/mL dose level Inhibits JNK activity (a major cause of neurotoxic effects of 6-OHDA) acts as an effective strategy to treat PD 1,9-P concentration in tissue kidney > brain > liver > lungs > heart > spleen Improved bioavailability and longer half-life 	Ambhore et al. (2017)

Tabella 3.2 Agenti terapeutici e biomateriali utilizzati o in fase di studio per il morbo di Parkinson.

La cura del morbo di Parkinson ha subito un'importante trasformazione con l'utilizzo di nanoparticelle, fattori di crescita e di nuove terapie. Questi nuovi approcci dovrebbero aumentare l'efficienza delle modalità terapeutiche esistenti. Tuttavia, sono necessari ulteriori studi per valutare la loro capacità di agire come opzioni terapeutiche indipendenti o adiuvanti, nonché per superare i limiti esistenti nel trattamento e nella gestione del PD. La Figura 3.1 illustra le varie strategie terapeutiche che sono state esplorate per il trattamento del PD [1][32].

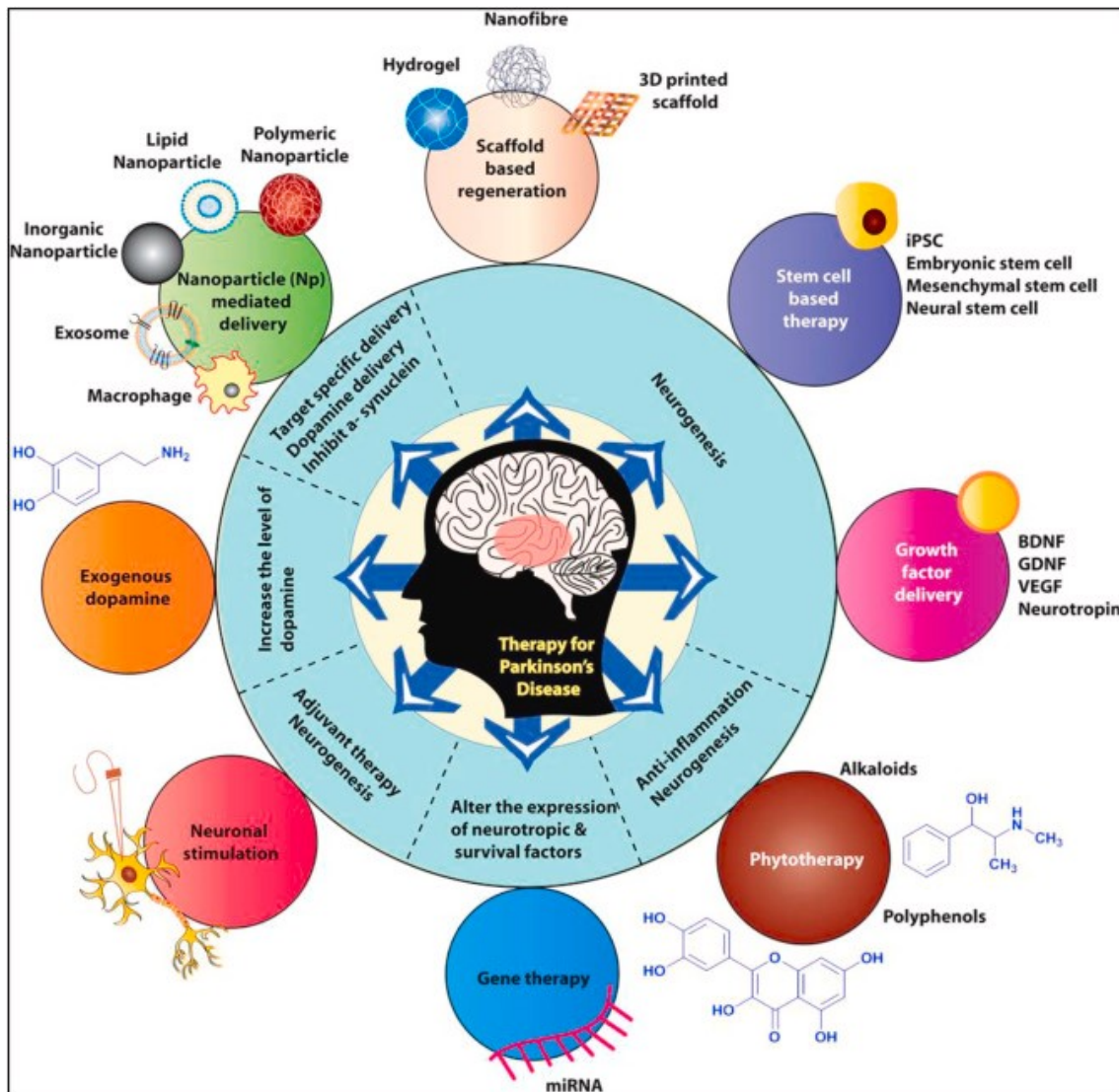


Figura 3.1 Strategie terapeutiche per il morbo di Parkinson.

3.2.1 Hydrogel nel morbo di Parkinson

Per quanto riguarda il morbo di Parkinson, molti ricercatori si sono concentrati sulla somministrazione di dopamina. Senthilkumar e colleghi nel 2007 hanno studiato l'effetto della somministrazione di dopamina rispettivamente da destrano/gelatina e di chitosano/gelatina

idrogel. Entrambi i tipi di idrogel hanno mostrato un buon rilascio del farmaco e Senthilkumar ha inoltre notato un miglioramento comportamentale e motorio nei topi con PD dopo il trattamento [40].

Oltre a ciò, diversi fattori neurotrofici come BDNF (fattore neurotonico cerebrale, proteina appartenente alla famiglia delle neurotrofine), GDNF (fattore neurotonico derivato dalla glia) e il fattore di crescita epidermico sono stati forniti e combinati con neuroni dopaminergici derivati da cellule staminali embrionali in diverse tipologie di idrogel. Questi fattori neurotrofici sono stati studiati come trattamento terapeutico per i disturbi neurodegenerativi con il morbo di Parkinson e di Alzheimer, per le loro proprietà di neuroprotezione e neurogenesi. Nel 2019, Ucar e Humpel hanno incapsulato il GDNF in idrogel di collagene notando un miglioramento della sopravvivenza delle cellule dopaminergiche, mentre nel 2016 Wang e colleghi avevano già notato che il GDNF rilasciato da un acido poli-L-lattico/idrogel xiloglucano supportava la crescita delle fibre nervose e la reinnervazione dello striato¹⁴ in un modello murino di PD [41]. Ancora più interessante è la possibilità di impiantare costrutti che riescono ad imitare i ‘percorsi’ assonali. Nel 2018, Struzyna e colleghi hanno incapsulato neuroni dopaminergici derivati da cellule staminali embrionali in microcolonne di idrogel per ricostruire i tratti assonali della via nigrostriatale¹⁵[42][1][32].

3.2.2 Nanoparticelle (NP) per il trattamento del morbo Parkinson

Nel morbo di Parkinson, la levodopa è il farmaco più frequentemente utilizzato nel trattamento della malattia, sebbene causi numerosi effetti avversi. È stato dimostrato che il caricamento di estere metilico di Levodopa nelle NP poli- (acido lattico-co-glicolico) (PLGA) elimina gli effetti avversi della Levodopa come la discinesia¹⁶. Inoltre, è stato dimostrato che l'uso di NP lipidiche migliorava il rilascio di dopamina nel cervello. Anche gli agonisti della dopamina (ad es. Bromocriptina e inibitori della NADPH ossidasi) sono stati incapsulati in NP per migliorare il loro rilascio al cervello e per ottenere benefici per alcuni sintomi del morbo di Parkinson.

I vettori a base di lipidi come liposomi, nanoparticelle lipidiche solide (SLN) e composti polimerici lipidici sono stati ampiamente esplorati per la somministrazione di farmaci. Il vantaggio di questi vettori è la loro natura autoassemblante, la loro biocompatibilità, la

¹⁴ O nucleo della base, componente sottocorticale del telencefalo; è la stazione di input più importante del sistema dei nuclei della base, che comprendono anche la pars reticulata della substantia nigra e il subtalamo.

¹⁵ Via dopaminergica che collega la substantia nigra pars compacta con lo striato dorsale.

¹⁶ Ogni movimento anormale e incontrollato dei muscoli volontari o involontario, come spasmi, sussulti o irrequietezza dovuti ai trattamenti con Levodopa. Da distinguere dal tremore che contraddistingue il morbo di Parkinson.

biodegradabilità e la suscettibilità alla funzionalizzazione della superficie. I liposomi nanodimensionali possiedono la capacità di incapsulare molecole sia idrofiliche che idrofobiche grazie alla loro natura anfipatica. In un tipico esempio, sono state formate vescicole liposomiali autoassemblanti che incapsulano il derivato della dopamina, N-bis(3,4-pivaloilossidopamina), utilizzando la miscela lipidica comprendente il lipide S100, colesterolo e distearoilfosfatidiletanolamina-PEG (DSPE-PEG). Il vettore è stato coniugato in superficie con un peptide 29-mer RVG-29 (peptide che ha migliorato significativamente l'efficienza terapeutica del sistema di rilascio liposomiale) derivato dalla glicoproteina virale della rabbia per migliorare la sua capacità di attraversare il BBB e consentire il suo legame con il recettore nicotinico dell'acetilcolina presente nei neuroni dopaminergici. I liposomi somministrati per via endovenosa hanno permeato efficacemente la BBB, aumentato i livelli di cellule positive alla dopamina e alla tirosina idrossilasi nello striato e ridotto lo stress ossidativo.

Un vettore a base lipidica ampiamente utilizzato sono le nanoparticelle lipidiche solide (SLN), preparate da trigliceridi ed un emulsionante, e possono ospitare le frazioni lipofiliche in modo efficiente. Allo stesso modo, anche i vettori lipidici nanostrutturati (NLC) costruiti utilizzando componenti lipidici eterogenei possono ospitare il carico in maniera efficiente [43]. Le SLN preparate utilizzando tristearina e tricaprino sono state utilizzate per incapsulare la bromocriptina agonista della dopamina ergolina. Il farmaco incapsulato ha mostrato un rilascio prolungato e un'acinesia visibilmente ridotta nei topi con PD [44]. Le SLN preparate da acido stearico, polossamero¹⁷ e lecitina e caricate con l'astaxantina carotenoide antiossidante, sono stati aggiunti alle cellule PC12 esposte a stress ossidativo da H₂O₂. Il trattamento ha invertito gli effetti avversi dello stress ossidativo, una caratteristica importante della maggior parte delle malattie neurodegenerative, compreso il PD. La biodistribuzione di questi SLN somministrati per via intranasale ha confermato il loro maggiore accumulo nel cervello [45]. Questo sistema necessita di validazione terapeutica per l'uso come terapia adiuvante nella gestione del PD. In uno studio recente, tre diverse formulazioni a base di lipidi sono state confrontate per la loro efficacia contro i deficit indotti da PD nei roditori quando somministrati in forma topica. SLN e NLC sono stati fabbricati ed è stato poi incapsulato l'agonista della dopamina ropinirolo. La terza formulazione era una dispersione degli SLN e degli NLC caricate con il farmaco in una matrice di idrogel di carbopol. Tra le tre formulazioni, il sistema idrogel ha mostrato delle migliori caratteristiche come il rilascio prolungato, irritazione cutanea minima e

¹⁷ O poloxamer, è un tensioattivo non ionico composto da tre blocchi polimerici.

biodisponibilità. Gli studi in vivo hanno mostrato livelli elevati di dopamina e di enzimi antiossidanti nei topi indotti da PD trattati con la formulazione di idrogel [46][1][32].

3.3 Nanomateriali a base di carbonio per il morbo di Parkinson e di Alzheimer

Nell'ambito di ricerca delle malattie neurodegenerative si parla di interfacce neurali nanostrutturate quando ci sono materiali nanostrutturati in grado di interagire con le cellule del sistema nervoso e quindi di supportare, modificare, o indurre la struttura e la funzione delle cellule nervose. L'elevato potenziale dell'applicazione di nanomateriali e delle nanotecnologie per generare interfacce neurali è dovuto all'alta biocompatibilità in vitro di questi materiali rispetto alle cellule neuronali. Le loro caratteristiche peculiari come l'elevata resistenza meccanica e la conducibilità elettrica, combinate con le loro dimensioni molto piccole, che forniscono un intimo contatto con le cellule, ne consentono l'applicazione sia come supporto per la neurorigenerazione, sia come materiale efficace in una stimolazione dell'attività funzionale neuronale precisa.

Il materiale perfetto per costruire protesi neuronali e le interfacce non esiste, ma i materiali a base di carbonio hanno dimostrato di avere delle grandi potenzialità.

Si vedono di seguito due materiali, grafene e nanotubi a base di carbonio, che vengono maggiormente utilizzati nello studio della riparazione neuronale [1][32].

3.3.1 Grafene

Poiché il grafene è un materiale flessibile simile a un foglio, può essere facilmente applicato sulla superficie delle strutture polimeriche. Oltre agli scaffold ibridi di grafene-polimero, è interessante notare che il grafene stesso è stato segnalato per essere in grado di formare strutture tridimensionali complesse adatte alla crescita cellulare a lungo termine senza mostrare citotossicità ed altri effetti avversi. Recentemente, il grafene è risultato utile anche come adesivo cellulare efficace nella prevenzione delle cellule impiantate dalla morte cellulare mediata da specie reattive dell'ossigeno (ROS), migliorando così l'efficienza terapeutica delle cellule staminali mesenchimali.

Un fattore importante da considerare è la topografia della superficie e, come detto più volte, le proprietà meccaniche del micro-ambiente; Solanki riportò, ad esempio, come un pattern a griglia promuovesse la differenziazione neurale, mentre un pattern quadrato quella gliale [49]. La topografia è importante per la guida della crescita dei neuriti. Lee e i suoi colleghi svilupparono un modello di linea molto preciso con una larghezza di 15 μm e una spaziatura di 8 μm . Questo tipo di topografia è stata segnalata non solo per migliorare l'adesione e la crescita

dei neuroni ippocampali primari, ma anche per influenzare la direzione di crescita dei neuriti [50].

Questi modelli, a differenza di quelli in 2D precedenti, possono essere utilizzati per la generazione di uno scaffold 3D.

L'ingegneria tissutale punta alla rigenerazione tridimensionale di tessuti e organi, facendo ricorso a strutture che siano in grado di garantire un efficiente metabolismo cellulare, il trasporto di ossigeno e nutrienti e la rimozione di rifiuti. Gli scaffold 3D di grafene introducono una neuroinfiammazione molto più lieve di quelli 2D, consentendo una migliore biocompatibilità (un esempio sono le schiume di grafene che hanno dimostrato di supportare la crescita e la differenziazione delle cellule neurali).

I nanomateriali della famiglia del grafene sono solitamente usati come materiale di supporto bioattivo, ma possono essere utilizzati come materiali di interfaccia per neuroni negli scaffold compositi.

La rigenerazione neurale con materiali a base di grafene è stata testata in un piccolo numero di modelli in vivo. Wang e colleghi hanno testato uno scaffold nanofibroso combinato con grafene in un modello di topo con una lesione del nervo sciatico. Hanno scoperto che la rigenerazione dei nervi e la conseguente funzionalità erano simili all'autotrapianto (gold standard) [51]. Nello studio di Qian e colleghi, gli effetti dei nanoscaffold di grafene nella riparazione dei nervi sono stati valutati sia in vitro che in vivo, mostrando un eccellente recupero funzionale e morfologico, ancora una volta equivalenti a quelli degli autoinnesti. È interessante notare che hanno trovato una caratteristica pro-angiogenica (ovvero che stimola la crescita di vasi sanguigni) del grafene, ma per studiare il potenziale meccanismo alla base di questo fenomeno chiave sono necessari ulteriori studi [52][1][32] [47-48].

3.3.2 Nanotubi di carbonio

I nanotubi di carbonio (CNT) sono fogli di grafite arrotolati in tubi cilindrici con un diametro compreso tra 0,4 e 2 nm e con lunghezze che vanno da centinaia di nanometri a micrometri. Possono essere suddivisi in CNT a parete singola (SWCNT) e CNT a più pareti (MWCNT), a seconda della loro geometria. Come il grafene, i CNT possono condurre stimoli elettrici, rendendoli adatti all'ingegneria dei tessuti neurali. 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 allo scaffold per migliorare l'effetto dei CNT. Imaninezhad e colleghi hanno scoperto che uno scaffold composto da polietilenglicole e MWCNT ha migliorato la crescita e la lunghezza dei neuriti, che possono

essere significativamente migliorate dalla stimolazione elettrica di 2 volte e 1,8 volte [54]. Un'altra ricerca simile ha ipotizzato che la stimolazione elettrica abbia migliorato non solo l'estensione dei neuriti, ma anche la proliferazione, la migrazione cellulare e le connessioni intracellulari, che sono tutte fondamentali per la rigenerazione dei nervi [55]. I CNT possono essere utilizzati senza dare stimolazione elettrica poiché forniscono al biomateriale un potenziale differenziale che si è rivelato sufficientemente efficace da consentire la crescita dei neuriti e la rigenerazione neurale. Shestha e colleghi hanno sviluppato uno scaffold in poliuretano-seta aggiunto con MWCNT e hanno dimostrato che migliorava significativamente la differenziazione e la maturazione neurale P12 con la ricrescita assonale [57]. Gli SWCNT possono fornire proprietà di conducibilità sufficienti per la differenziazione neurale. Bordoni e colleghi hanno scoperto che SH-SH5Y differenzia completamente e genera sinapsi mature quando viene coltivato su uno scaffold a base di SWCNTS/cellulosa aprendo le possibilità per un nuovo approccio alla rigenerazione neurale [57].

La possibilità di fornire conducibilità senza stimolazione esterna è fondamentale per l'ingegneria tissutale perché può essere facilmente fornita in vitro, mentre è difficile da ottenere in vivo.

Gli studi in vivo sono complicati dalla tossicità che può causare l'impianto basato su CNT, sebbene pochi gruppi abbiano valutato l'effetto dei CNT in una situazione in vivo; questo perché l'interazione fisica tra grafene e la membrana cellulare è considerata il principale meccanismo di tossicità indotta da grafene. I CNT sono stati utilizzati sia per la rigenerazione neurale che nervosa. Per la rigenerazione neurale, Marei e il suo gruppo di ricerca hanno innestato cellule staminali neurali isolate da un bulbo olfattivo umano in un modello di topo. Hanno dimostrato che un co-innesto con CNT ha fornito supporto, aumentando la loro tendenza a differenziarsi in neuroni piuttosto che in cellule gliali [58]. Per la rigenerazione dei nervi, due studi hanno dimostrato gli effetti positivi dei CNT: nel primo, Ahn et al. hanno utilizzato un modello di lesione del nervo sciatico in un modello di topo e hanno scoperto che nello scaffold composito CNT il numero di assoni rigenerati che attraversano lo scaffold, l'area della sezione trasversale dei muscoli reinnervati e i risultati elettrofisiologici, erano tutti significativamente migliorati [59]; nel secondo, Lee et al. hanno sviluppato un'impalcatura neurale MWCNT-idrogel e scoperto che i CNT promuovevano la crescita degli assoni [60][1][32][45].

Conclusione

I disturbi neurodegenerativi rimangono quindi una sfida clinica, ma i biomateriali rappresentano per questa sfida uno strumento promettente. Come visto in precedenza, i biomateriali possono avere composti naturali e/o sintetici. I materiali descritti presentano diverse caratteristiche, ma tutti si eguagliano per la loro biocompatibilità, biofunzionalità, bioinerzia, biodegradabilità, e sterilizzabilità.

Alcuni materiali, come idrogel e nanoparticelle, sono risultati maggiormente adatti nel trattamento di disturbi neurodegenerativi per le loro specifiche caratteristiche. I biomateriali idrogel sono stati descritti come ottimali per la creazione di scaffold per la cultura e differenziazione delle cellule staminali, e successivamente sono stati studiati anche per il trasporto di fattori di crescita specifici per il supporto, la crescita e la differenziazione cellulare. Questi fattori di crescita neurotrofici sono estremamente importanti per la sopravvivenza delle cellule trapiantate, perché nelle terapie per le malattie neurodegenerative la creazione di un microambiente protettivo stabile nel tempo è di fondamentale importanza per non portare le cellule trapiantate al progressivo deterioramento (conseguenza della malattia). Le nanoparticelle, invece, sono state studiate per il trasporto di farmaci e specifiche molecole attive e protettive per il trattamento di disturbi neurodegenerativi.

Dall'altra parte, SAP, nanofibre, e i nanomateriali a base di carbonio sono stati riportati per essere maggiormente utili nella riparazione dei nervi danneggiati. SAP e nanofibre hanno entrambi una struttura tale da facilitare la corretta guida degli assoni, promuovendo e supportando la crescita assonale. I biomateriali a base di carbonio, infine, grazie alla loro capacità di condurre corrente elettrica sono stati particolarmente utili nella rigenerazione assonale.

Nonostante molti biomateriali siano stati testati sia in vitro che in vivo in modelli animali, devono ancora essere condotti molti studi prima di applicare tali materiali nella rigenerazione neurale umana. Questo perché oltre ad avere molti risultati positivi, possono avere anche effetti negativi che possono mettere in pericolo la salute dell'uomo; ad esempio portando a stress ossidativo o ad infiammazioni.

Tuttavia, ci si aspetta grandi progressi dai futuri studi nel campo dei biomateriali per trattare i disturbi neuronali e le malattie neurodegenerative.

Bibliografia

[1] Biomaterials in Neurodegenerative Disorders: A Promising Therapeutic Approach.

Matteo Bordoni, Eveljn Scarian, Federica Rey, Stella Gagliardi, Stephana Carelli, Orietta Pansarasa and Cristina Cereda

International Journal of Molecular Sciences, (2020), 21(9), 3243.

[2] Pathology of Neurodegenerative Diseases.

Brittany N. Dugger, Dennis W. Dickson

Cold Spring Harb Perspect Biol. , (2017), 9(7), 23.

[3] Neuronal Cell Death Mechanisms in Major Neurodegenerative Diseases.

Hao Chi, Hui-Yun Chang, and Tzu-Kang Sang.

International Journal of Molecular Sciences, (2018), 19(10), 3082.

[4] Parkinson's Disease and Parkinsonism: Neuropathology.

Dennis W. Dickson

Cold Spring Hard Perspectives in Medicines, (2012), 16.

[5] Parkinson's Disease: Mechanisms and Models.

Wiliam Dauer and Serge Przedborski

Neuron, Cell Press, (2003),39(6), 889–909.

[6] Next Generation Nerve Guides: Materials, Fabrication, Growth Factors, and Cell Delivery.

Juliet H.A. Bell, John W. Haycock

Tissue engineering part B, (2011), 18(2), 116-128.

[7] Neuropathological Alterations in Alzheimer Disease.

Alberto Serrano-Pozo, Matthew P. Frosch, Eliezer Masliah, and Bradley T. Hyman

Cold Spring Harb Perspect Med., (2011), 1(1), 24.

[8] Crossing the Blood–Brain Barrier: Recent Advances in Drug Delivery to the Brain.

Mayur M. Patel, Bhoomika M. Patel
CNS drugs (2017), 31(2), 109–133.

[9] Macroscopic findings of brain with dementia.

Yoshio Hashizume
Japanese society of Neuropathology, (2022), 14.

[10] Collagen for brain repair therapeutic perspectives.

Ucar, Buket, Humpel, Christian Ph.D.
Neural Regeneration Research, (2018), 13(4), 595-598.

[11] Tau protein in neurodegenerative diseases – a review.

Denisa Floriana Basilica Pirscovenau, Ionica Pirici, Valerica Tudorica, Tudor-Adrian Balsenau,
Valeria- Carmen Albu, Simona Bondari, Ana-maria Bumbea, Mircea Pirscovenau
Romanian Journal of Morphology & Embryology, (2017), 58(4), 10.

[12] Biomateriali della scienza dei materiali alle applicazioni cliniche.

Andrea Bagno, Carlo Di Bello,
Patròn Editore, (2016), 370-380.

[13] Neuropathologic changes in Alzheimer's disease.

Gary L. Wenk, Ph.D.,
J Clin Psychiatry, 2003, 64, 7-10.

[14] Reservoir-Based Drug Delivery Systems Utilizing Microtechnology.

Cynthia L. Stevenson, John T. Santini, Jr., Robert Langer
Advanced drug Delivery Reviews, (2012), 64(14), 1560-1602.

[15] Adult cell therapy for brain neuronal damages and the role of tissue engineering.

Gaëtan J.-R.Delcroix, Paul C.Schillerc, Jean-PierreBenoita, Claudia N.Montero-Meneia
Elsevier, Biomaterials, (2010), 31(8), 2105-2120.

[16] In vitro and in vivo studies of electroactive reduced graphene oxide-modified nanofiber scaffolds for peripheral nerve regeneration.

Juan Wang, Yuan Cheng, Liang Chen, Tonghe Zhu, Kaiqiang Ye, Chao Jia, Hongjun Wang, Meifang Zhu, Cunyi Fan, Xiumei Mo,
Acta Biomaterialia 84 Elsevier, (2019), 84, 98-113.

[17] Multidisciplinary perspectives for Alzheimer's and Parkinson's diseases: hydrogels for protein delivery and cell-based drug delivery as therapeutic strategies.

Carmen Giordano, Diego Albani, Antonio Gloria, Marta Tunesi, Sara Batelli, Teresa Russo, Gianluigi Forloni, Luigi Ambrosio, Alberto Cigada,
The International Journal of Artificial Organs, (2009), 32(12), 836-850.

[18] Hydrogels and Their Applications in Targeted Drug Delivery.

Radhika Narayanaswamy and Vladimir P. Torchilin,
Molecules, (2019), 24(3), 603.

[19] 3D Cell Culture Systems: Tumor Application, Advantages, and Disadvantages.

Ola Habanjar Mona Diab-Assaf, Florence Caldefie-
Chezet, and Laetitia Delort,
International Journal of Molecular Sciences, (2021), 22(22), 12200.

[20] Neurodegenerative diseases and effective drug delivery: A review of challenges and novel therapeutics.

Amna AkhtarAnisa AndleebTayyba Sher WarisMasoomeh BazzarAli-Reza
MoradiNasir Raza AwanMuhammad Yar,
Journal of Controlled Release, (2021), 330, 1152-1167.

[21] From blood–brain barrier to blood–brain interface: new opportunities for CNS drug delivery.

William A. Banks,
Nature Reviews Drug Discovery, (2016), 15(4), 275-292.

[22] Key for crossing the BBB with nanoparticles: the rational design.

Sonia M. Lombardo, Marc Schneider, Akif E. Türeli and Nazende Günday Türeli,
Beilstein J. Nanotechnol., (2020), 11, 866–883.

[23] Carbon nanostructures: The drug and the delivery system for brain disorders.

T.K. Henna, V.R. Rapheya, Renu Sankara, V.K. Ameena Shirina, H.V. Gangadharappab, K. Pramoda,
International Journal of Pharmaceutics, (2020), 587-119701.

[24] Fabrication, characterization and in vitro evaluation of aligned PLGA-PCL nanofibers for neural regeneration.

Subramanian A., Krishnan U.M., Sethuraman S.
Ann. Biomed. Eng. 2012; 40, 2098–2110.

[25] Interaction of iPSC-derived neural stem cells on poly (L-lactic acid) nanofibrous scaffolds for possible use in neural tissue engineering.

Lin C., Liu C., Zhang L., Huang Z., Zhao P., Chen R., Pang M., Chen Z., He L., Luo C., et al.
Int. J. Mol. Med. 2018; 41, 697–708.

[26] Genipin-treated chitosan nanofibers as a novel scaffold for nerve guidance channel design.

Lau Y.T., Kwok L.F., Tam K.W., Chan Y.S., Shum D.K., Shea G.K.
Colloids Surf. B Biointerfaces., 2018; 162:126–134.

[27] A novel polycaprolactone/carbon nanofiber composite as a conductive neural guidance channel: An in vitro and in vivo study.

Farzamfar S., Salehi M., Tavangar S.M., Verdi J., Mansouri K., Ai A., Malekshahi Z.V., Ai J.
Prog. Biomater., 2019; 8:239–248.

[28] Polymeric nanofibrous nerve conduits coupled with laminin for peripheral nerve regeneration.

Chang W., Shah M.B., Zhou G., Walsh K., Rudraiah S., Kumbar S.G., Yu X.
Biomed. Mater., 2020; 15(3).

[29] The promotion of neurite sprouting and outgrowth of mouse hippocampal cells in culture by graphene substrates.

Li N., Zhang X., Song Q., Su R., Zhang Q., Kong T., Liu L., Jin G., Tang M., Cheng G.
Biomaterials. 2011; 32:9374–9382.

[30] Biomaterials for the Treatment of Alzheimer's Disease.

Darya Hadavi, André A. Poot

Front. Bioeng. Biotechnol., 2016,4-49.

[31] Biomaterials in treatment of Alzheimer's disease.

Mukta Agrawal, Eluri Prathyusha, Hafiz Ahmed, Sunil Kumar Dubey, Prashant Kesharwani, Gautam Singhvi, V.G.M.Naidu, Amit Alexander

Neurochemistry International, 2021, 145.

[32] Biomaterials in the treatment of Parkinson's disease.

Uma Maheswari Krishnan

Neurochemistry International, 2021, 145, 1-15.

[33] Allopregnanolone as regenerative therapeutic for Alzheimer's disease: translational development and clinical promise.

Irwin, R. W., and Brinton, R. D.

Prog. Neurobiol., 2014, 113, 40–55.

[34] Masitinib for the treatment of mild to moderate Alzheimer's disease.

Folch, J., Petrov, D., Ettcheto, M., Pedrós, G., Abad, S., Beas-Zaratec, C., et al.

Expert Rev. Neurother., 2015, 15, 587–596.

[35] New drug treatments show neuroprotective effects in Alzheimer's and Parkinson's diseases.

Hölscher, C.

Neural. Regen. Res., 2014, 9, 1870–1873.

[36] Novel d-penicillamine carrying nanoparticles for metal chelation therapy in Alzheimer's and other CNS diseases.

Cui et al., 2005. Cui, Z., Lockman, P. R., Atwood, C. S., Hsu, C.-H., Gupte, A., Allen, D. D., et al.

Eur. J. Pharm. Biopharm., 2005, 59, 263–272.

[37] Metal-protein attenuation with iodochlorhydroxyquin (clioquinol) targeting A β amyloid deposition and toxicity in Alzheimer disease: a pilot phase 2 clinical trial.

Ritchie, C. W., Bush, A. I., Mackinnon, A., Macfarlane, S., Mastwyk, M., and Tammer, A. Arch. Neurol., 2003, 60, 1685–1691.

[38] Targeted nanoparticles for drug delivery through the blood-brain barrier for Alzheimer's disease.

Roney et al., 2005. Roney, C., Kulkarni, P., Arora, V., Antich, P., Bonte, F., Wu, A., et al. J. Control Release, 2005, 108, 193–214.

[39] Gold-nanoparticle-based multifunctional amyloid- β inhibitor against Alzheimer's disease.

Gao, N., Sun, H., Dong, K., Ren, J., and Qu, X Chemistry, 2015, 21, 829–835.

[40] Unilateral implantation of dopamine-loaded biodegradable hydrogel in the striatum attenuates motor abnormalities in the 6-hydroxydopamine model of hemi-parkinsonism.

Senthilkumar K.S., Saravanan K.S., Chandra G., Sindhu K.M., Jayakrishnan A., Mohanakumar K.P.

Behav. Brain Res., 2007; 184:11–18.

[41] Therapeutic efficacy of glial cell-derived neurotrophic factor loaded collagen scaffolds in ex vivo organotypic brain slice Parkinson's disease models.

Ucar B., Humpel C.

Brain Res. Bull., 2019; 149:86–95.

[42] Tissue engineered nigrostriatal pathway for treatment of Parkinson's disease.

Struzyna L.A., Browne K.D., Brodnik Z.D., Burrell J.C., Harris J.P., Chen H.I., Wolf J.A., Panzer K.V., Lim J., Duda J.E., et al.

J. Tissue Eng. Regen. Med., 2018; 12:1702–1716

[43] Nanostructured lipid carriers: a groundbreaking approach for transdermal drug delivery.

I. Chauhan, M. Yasir, M. Verma, A.P. Singh

[44] Solid lipid nanoparticles as delivery systems for bromocriptine.

Esposito, M. Fantin, M. Marti, M. Drechsler, L. Paccamiccio, P. Mariani, E. Sivieri, F. Lain, E. Menegatti, M. Morari, R. Cortesi
Pharm. Res., 2008, 25, 1521-.

[45] Nose to brain delivery of astaxanthin-loaded solid lipid nanoparticles: fabrication, radio labeling, optimization and biological studies.

P.C. Bhatt, P. Srivastava, P. Pandey, W. Khan, B.P. Panda
RSC Adv., 2016, 6, 10001-.

[46] Neuroprotective effect of ropinirole lipid nanoparticles enriched hydrogel for Parkinson's disease: in vitro, ex vivo, pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation.

N.Dudhipala, T. Gorre
Pharmaceutics, 2020, 12, 148.

[47] In vitro and in vivo studies of electroactive reduced graphene oxide-modified nanofiber scaffolds for peripheral nerve regeneration.

JuanWang, YuanCheng, LiangChen, TongheZhu, Kaiqiang Ye, Chao Jia, Hongjun Wang, Meifang Zhu, Cunyi Fan, XiumeiMo
Acta Biomaterialia, 2019,84, 98-113.

[48] Graphene-Based Materials for Stem Cell Applications.

Tae-Hyung Kim, Taek Lee, Waleed A. El-Said, and Jeong-Woo Choi
Owen J. Guy, Academic Editor, 2015, 8(12), 8674–8690.

[49] Controlling differentiation of neural stem cells using extracellular matrix protein patterns.

Solanki A., Shah S., Memoli K.A., Park S.Y., Hong S., Lee K.B.
Small., 2010; 6, 2509–2513.

[50] Neurite guidance on laser-scribed reduced graphene oxide.

Lee S.H., Lee H.B., Kim Y., Jeong J.R., Lee M.H., Kang K.

Nano Lett. 2018; 18, 7421–7427.

[51] 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., Mo X.

Acta Biomater. 2019; 84, 98–113.

[52] 3D fabrication with integration molding of a graphene oxide/polycaprolactone nanoscaffold for neurite regeneration and angiogenesis.

Qian Y., Song J., Zhao X., Chen W., Ouyang Y., Yuan W., Fan C.

Adv. Sci. (Wienh) 2018; 5, 1700499.

[53] Carbon nanotubes and graphene as emerging candidates in neuroregeneration and neurodrug delivery.

Agnes Aruna John, Aruna Priyadharshni Subramanian, Muthu Vignesh Vellayappan, Arunpandian Balaji, Hemanth Mohandas, and Saravana Kumar Jaganathan

Int J Nanomedicine. 2015; 10, 4267–4277.

[54] Directed and enhanced neurite outgrowth following exogenous electrical stimulation on carbon nanotube-hydrogel composites.

Imaninezhad M., Pemberton K., Xu F., Kalinowski K., Bera R., Zustiak S.P

J. Neural. Eng. 2018; 15, 056034.

[55] Effective nerve cell modulation by electrical stimulation of carbon nanotube embedded conductive polymeric scaffolds.

Zhou Z., Liu X., Wu W., Park S., Miller Li A.L., Terzic A., Lu L.

Biomater. Sci. 2018; 6, 2375–2385.

[56] A conducting neural interface of polyurethane/silk-functionalized multiwall carbon nanotubes with enhanced mechanical strength for neuroregeneration.

Shrestha S., Shrestha B.K., Lee J., Joong O.K., Kim B.-S., Park C.H., Kim C.S.

Mater. Sci. Eng. C Mater. Bio. Appl. 2019; 102, 511–523.

[57] 3D Printed Conductive Nanocellulose Scaffolds for the Differentiation of Human Neuroblastoma Cells.

Bordoni M., Karabulut E., Kuzmenko V., Fantini V., Pansarasa O., Cereda C., Gatenholm P. Cells. 2020; 9, 682.

[58] Nanotubes impregnated human olfactory bulb neural stem cells promote neuronal differentiation in Trimethyltin-induced neurodegeneration rat model.

Marei H.E., Elnegiry A.A., Zaghloul A., Althani A., Afifi N., Abd-Elmaksoud A., Farag A., Lashen S., Rezk S., Shouman Z. J. Cell. Physiol. 2017; 232, 3586–3597.

[59] 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., Hyun J.K. Acta Biomater. 2015; 13, 324–334.

[60] 3D printing nano conductive multi-walled carbon nanotube scaffolds for nerve regeneration.

Lee S.-J., Zhu W., Nowicki M., Lee G., Heo D.N., Kim J., Zuo Y.Y., Zhang L.G. J. Neural. Eng. 2018; 15.

[61] The proton permeability of self-assembled polymersomes and their neuroprotection by enhancing a neuroprotective peptide across the blood-brain barrier after modification with lactoferrin.

Yu Y., Jiang X., Gong S., Feng L., Zhong Y., Pang Z. Nanoscale. 2014; 6, 3250–3258.

[62] Amyloid self-assembling peptides: Potential applications in nanovaccine engineering and biosensing.

Al-Halifa S., Babych M., Zottig X., Archambault D., Bourgault S. Pept. Sci., 2019, 111, 24095.

[63] Self healing hydrogels composed of amyloid nano fibrils for cell culture and stem cell differentiation.

Jacob R.S., Ghosh D., Singh P.K., Basu S.K., Jha N.N., Das S., Sukul P.K., Patil S., Sathaye S., Kumar A., et al.

Biomaterials. 2015, 54, 97–105.

[64] The prion protein regulates beta-amyloid-mediated self-renewal of neural stem cells in vitro.

Collins S.J., Tumpach C., Li Q.X., Lewis V., Ryan T.M., Roberts B., Drew S.C., Lawson V.A., Haigh C.L.

Stem Cell Res. Ther., 2015, 6(1), 60.

[65] Self-Assembling Peptides as Extracellular Matrix Mimics to Influence Stem Cell's Fate.

Hellmund K.S., Koksche B.

Front. Chem., 2019, 7, 172.

[66] Functionalized α -Helical Peptide Hydrogels for Neural Tissue Engineering.

Mehrban N., Zhu B., Tamagnini F., Young F.I., Wasmuth A., Hudson K.L., Thomson A.R., Birchall M.A., Randall A.D., Song B., et al.

ACS Biomater. Sci. Eng., 2015, 1, 431–439.

[67] Integrating biomaterials and stem cells for neural regeneration.

Maclean F.L., Rodriguez A.L., Parish C.L., Williams R.J., Nisbet D.R

Stem Cells Dev., 2016, 25, 214–226

[68] Bioaccumulation and toxicity of gold nanoparticles after repeated administration in mice.

Lasagna-Reeves C., Gonzalez-Romeroa D., Barria M. A., Olmedo I., Ciosa A., Ramanujam V. M. S., et al.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 2010, 393, 649–655

[69] Nanoparticle-chelator conjugates as inhibitors of amyloid-beta aggregation and neurotoxicity: a novel therapeutic approach for Alzheimer disease.

Liu G., Men P., Kudo W., Perry G., Smith M. A.

Neurosci. Lett., 2009, 455, 187–190.