UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

INGEGNERIA TESSUTALE NEURALE: BIOMATERIALI E LORO APPLICAZIONI CLINICHE

Relatrice: Prof.ssa Monica Dettin

Laureando: Jason Scott

Matricola: 1232390

ANNO ACCADEMICO 2021 – 2022

Data di laurea: 16 novembre 2022

Introduzione all'Ingegneria Tessutale Neurale e alle sue applicazioni

L'Ingegneria Tessutale Neurale (in inglese *Neural Tissue Engineering*, acronimo *NTE*) è una branca dell'Ingegneria Tessutale (si veda figura 1) che si occupa della rigenerazione del tessuto nervoso sfruttando le peculiarità di alcuni biomateriali.

Si tratta di un campo in rapida evoluzione, estremamente multidisciplinare, che ha come obiettivi la stimolazione della crescita assonale e il differenziamento di neuroni e della nevroglia.

Questo ambito rappresenta una delle frontiere di ricerca che hanno quindi lo scopo di riparare i danni irreversibili che un soggetto può subire a livello nervoso, con il fine ultimo di poter ricreare i collegamenti bioelettrici che sono alla base del funzionamento del sistema nervoso.

Nello specifico, la *NTE* si incentra sullo sviluppo dei biomateriali che possono essere utilizzati a tale scopo.

In ambito di Nanomedicina esistono applicazioni dei biomateriali che hanno l'obiettivo di coadiuvare i trattamenti attualmente presenti per le malattie neurodegenerative, con il fine ultimo di trovare una vera e propria cura. A tal proposito, nell'ultimo capitolo relativo alle applicazioni cliniche verrà trattato il ruolo dei biomateriali nell'avanzamento delle terapie per la Sclerosi Multipla (*MS*).

Uno degli aspetti importanti della *NTE* è l'approccio autologo di medicina rigenerativa, in quanto l'idea alla base della rigenerazione neuronale è quella di stimolare la crescita delle componenti del tessuto nervoso a partire da cellule staminali del paziente stesso.

Questo approccio determina quindi che una volta inserite le cellule, le quali tramite differenziamento andranno a sostituire il tessuto danneggiato, non si abbia il rischio di rigetto e il paziente non debba essere sottoposto a trattamenti farmacologici immunosoppressivi.

Parlando di Medicina Rigenerativa, nel capitolo relativo ai biomateriali verrà trattato nel primo paragrafo il tema degli *hydrogel* e come queste strutture possano essere utilizzate quali vettori per la somministrazione a livello intratecale di cellule staminali per la rigenerazione di tessuto nervoso danneggiato a livello del midollo spinale: tali applicazioni rappresentano sicuramente il futuro della ricerca medica, in quanto possono consentire a pazienti paraplegici o addirittura tetraplegici di recuperare anche parzialmente la capacità di contrazione volontaria degli arti.

Il fulcro nevralgico dell'esistenza della *NTE* è l'incapacità del tessuto nervoso di rigenerarsi in modo autonomo una volta che subisce lesioni. Degno di menzione è anche l'apporto biotecnologico in questo settore, grazie al quale si registra una importante spinta nel settore della ricerca sulle cellule staminali, in quanto queste possono essere programmate per evolvere in un particolare tipo cellulare. A tal proposito, nel 2012 è stato conferito il Premio Nobel per la Medicina a due scienziati, Yamanaka e Gurdon, per il loro studio sulla riprogrammazione cellulare, precisamente per essere riusciti a

generare delle cellule staminali pluripotenti indotte (*iPS*), grazie anche all'utilizzo di tecniche di Ingegneria Genetica.

Per la *NTE* sono molto importanti i biomateriali, impalcature su cui le cellule nervose, in certe condizioni, possono crescere e moltiplicarsi, mentre le Biotecnologie studiano metodiche genetiche che a livello molecolare promuovono il controllo dello sviluppo delle cellule staminali.

Si può asserire perciò che l'unione di questi due ambiti possa portare a individuare un metodo non solo sperimentale ma in un prossimo futuro anche clinico per la restaurazione delle connessioni bioelettriche tra i vari tessuti del sistema nervoso, con una possibilità di cura del paziente che potrebbe così ritornare a compiere attività quotidiane e recuperare la qualità di vita che aveva perso.

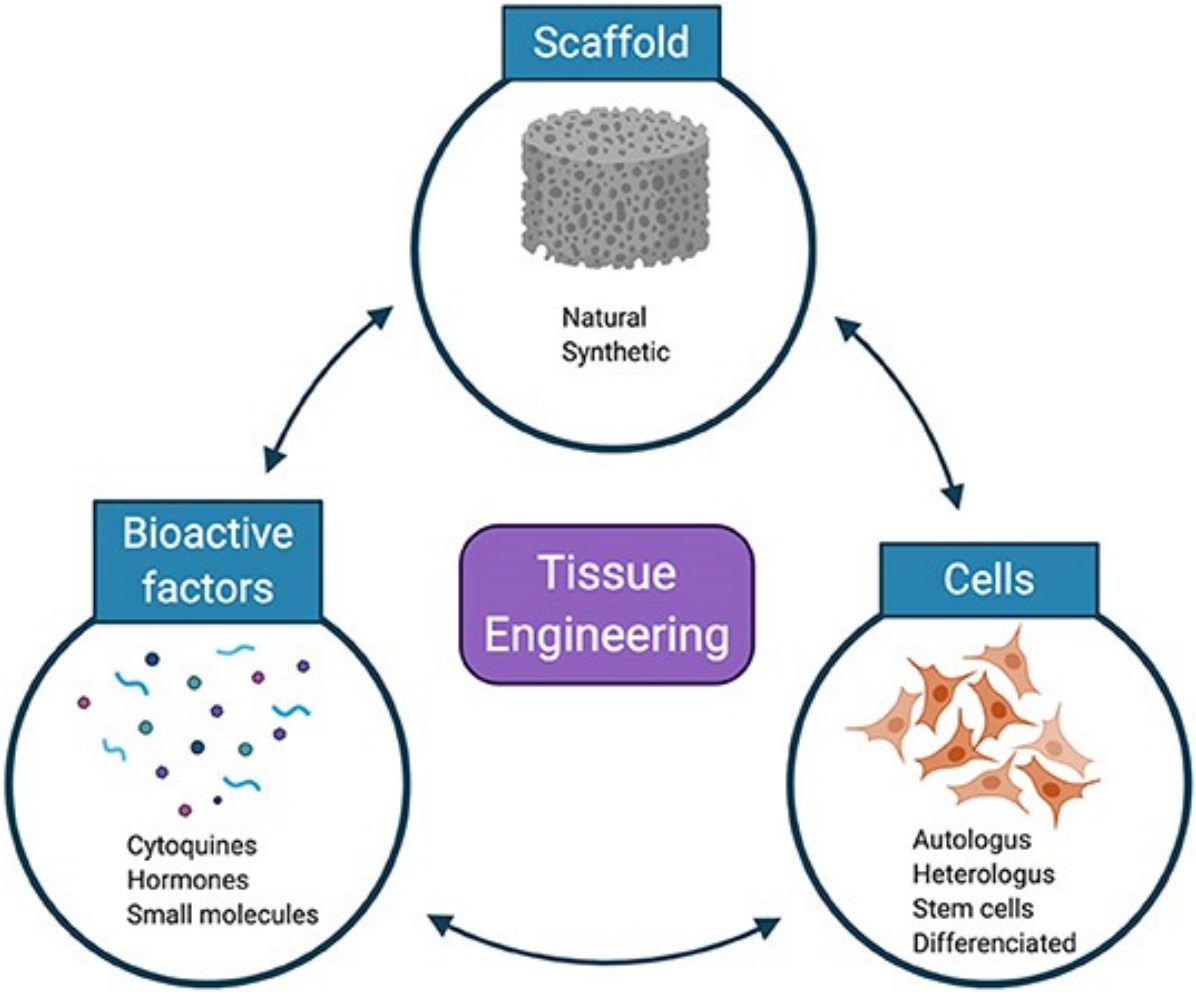


Figura 1: rappresentazione schematica delle componenti che fanno parte dell'Ingegneria Tessutale

Biologia e Fisiologia del Tessuto Nervoso

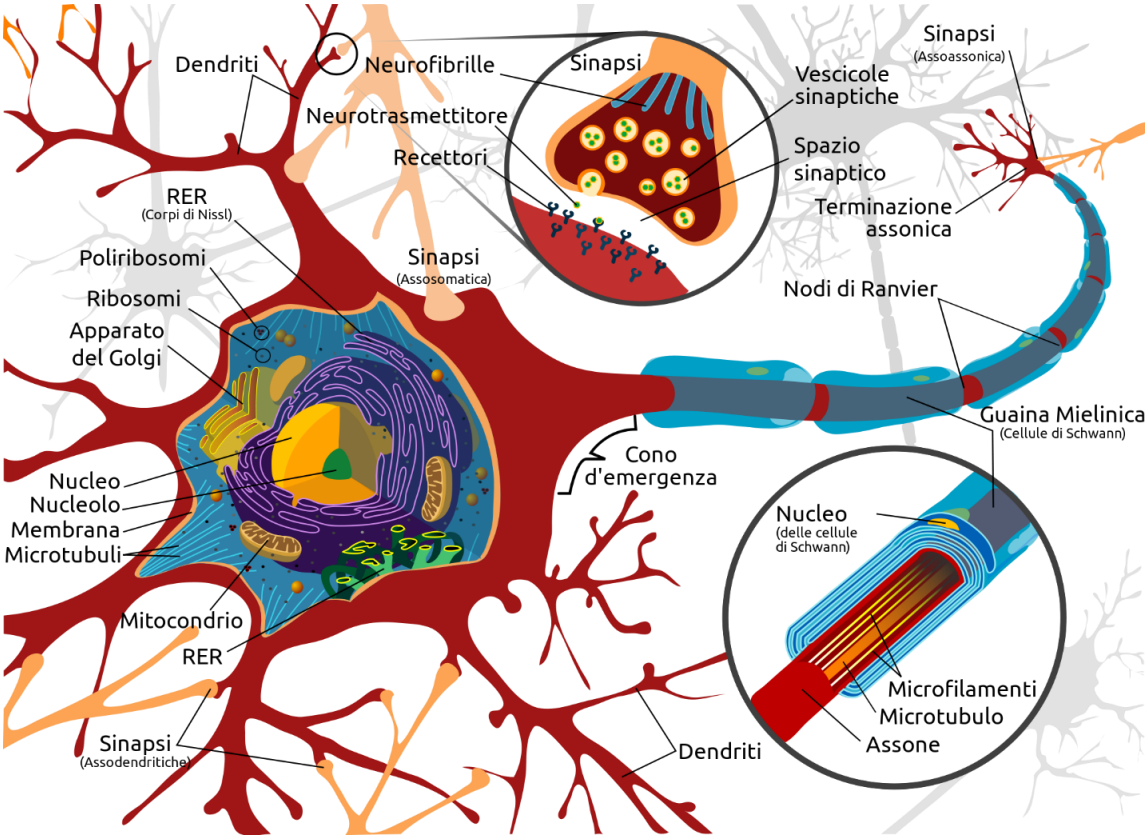


Figura 2.1: struttura di un neurone e delle sue diramazioni (neuriti)

Il tessuto nervoso è formato da due tipi di cellule:

- i neuroni (si veda figura 2.1 e figura 2.2);
- la nevroglia (cellule di sostegno).

I neuroni possono essere:

- sensitivi o afferenti, quando importano uno stimolo dalla periferia al sistema nervoso centrale (SNC);
- motori o efferenti, quando importano uno stimolo dal sistema nervoso centrale (SNC) alla periferia;
- di associazione (interneuroni), che si occupano dell'integrazione, dell'elaborazione e del tipo di risposta da fornire.

La sezione motoria si distingue in due sottospecie:

- sistema nervoso somatico, ovvero la porzione volontaria;
- sistema nervoso vegetativo o autonomo, ovvero la porzione involontaria, che si suddivide a sua volta in sistema ortosimpatico e sistema parasimpatico, che presentano funzioni opposte.

Le cellule di sostegno sono a loro volta costituite da più categorie di cellule, con specifiche funzioni biologiche, ma a livello di *NTE* ricoprono un ruolo importante:

- gli oligodendrociti a livello del sistema nervoso centrale (SNC);
- le cellule di Schwann a livello del sistema nervoso periferico (SNP).

Queste cellule infatti determinano la tipica conduzione saltatoria dello stimolo nervoso proveniente dal corpo cellulare del neurone grazie alla presenza della mielina che funge da isolante elettrico.
Le zone in cui non è presente la guaina mielinica prendono il nome di nodi di Ranvier, ed è dove avvengono i movimenti degli ioni Na^+ e K^+ che determinano la depolarizzazione della membrana dell'assone.
La depolarizzazione della membrana avviene in seguito ad uno stimolo elettrico, che deve avere un valore minimo per generare il potenziale d'azione ("risposta tutto o nulla"), in quanto è necessario una differenza di potenziale minima che vada a determinare l'apertura dei canali ionici membranali.
La connessione tra due neuroni avviene a livello delle sinapsi, in cui lo stimolo si propaga dall'assone del neurone da cui il potenziale d'azione si è generato al dendrite del neurone a cui lo stimolo è trasmesso.
A livello sinaptico si ha il rilascio nella fessura sinaptica di neurotrasmettitori, molecole che a seconda della categoria a cui appartengono, hanno un particolare effetto.
Esempi dei più comuni neurotrasmettitori sono adrenalina, noradrenalina, dopamina, serotonina, GABA e acetilcolina (quest'ultima è fondamentale per la contrazione muscolare e viene rilasciata nel bottone sinaptico tra motoneurone e fibra muscolare).
Da un punto di vista embrionale, il sistema nervoso si origina dal foglietto embrionale più esterno, che prende il nome di ectoderma.
Man mano che l'embrione si sviluppa verso lo stadio di feto, le cellule staminali si differenziano, e una volta completato il differenziamento, se alcuni neuroni subiscono danni o lesioni permanenti, il tessuto nervoso non è in grado di rigenerarsi in modo autonomo (al contrario del tessuto epiteliale).
Come poi verrà discusso nel capitolo sulle applicazioni cliniche, uno degli obiettivi principali è quello di ricreare le connessioni a livello spinale.
Il midollo spinale fa parte del Sistema Nervoso Centrale, ed è racchiuso all'interno dei forami intervertebrali, i quali sono intervallati a livello del corpo vertebrale dai dischi intervertebrali.
Da un punto di vista anatomico, il midollo spinale è superiormente collegato al midollo allungato, che fa parte dell'encefalo, e a partire dal grande forame occipitale, che si articola con la prima vertebra cervicale chiamata atlante, i tessuti fanno parte del midollo spinale e non più dell'encefalo.
Se si seziona trasversalmente il midollo spinale (si veda figura 3), questo ha una particolare morfologia a farfalla, in cui si può distinguere la sostanza grigia, costituita dai corpi cellulari dei neuroni, e la sostanza bianca, costituita da un intricato sistema di connessioni mielinizzate.

Dal midollo spinale si diramano 31 paia di nervi, e la porzione inferiore del midollo spinale degenera nella cosiddetta cauda equina, costituita da un fascio di nervi spinali. Anatomicamente, si possono distinguere 4 macro sezioni del midollo spinale, ciascuna deputata a ricevere informazioni e gestire diverse zone del corpo, tutte esternamente protette dal liquido cefalorachidiano.

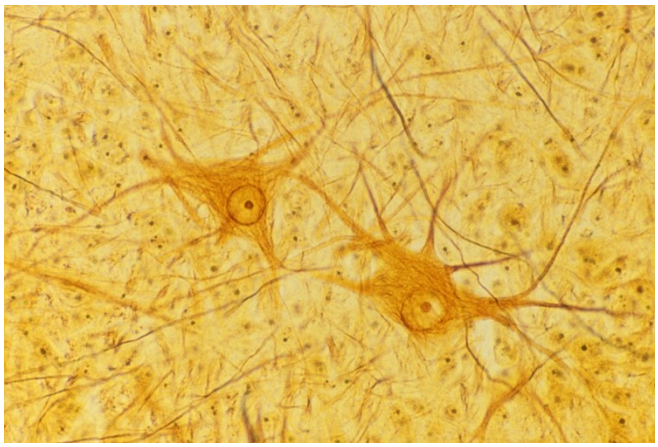


Figura 2.2.: vetrino istologico di neuroni colorati con metodo di Cajal

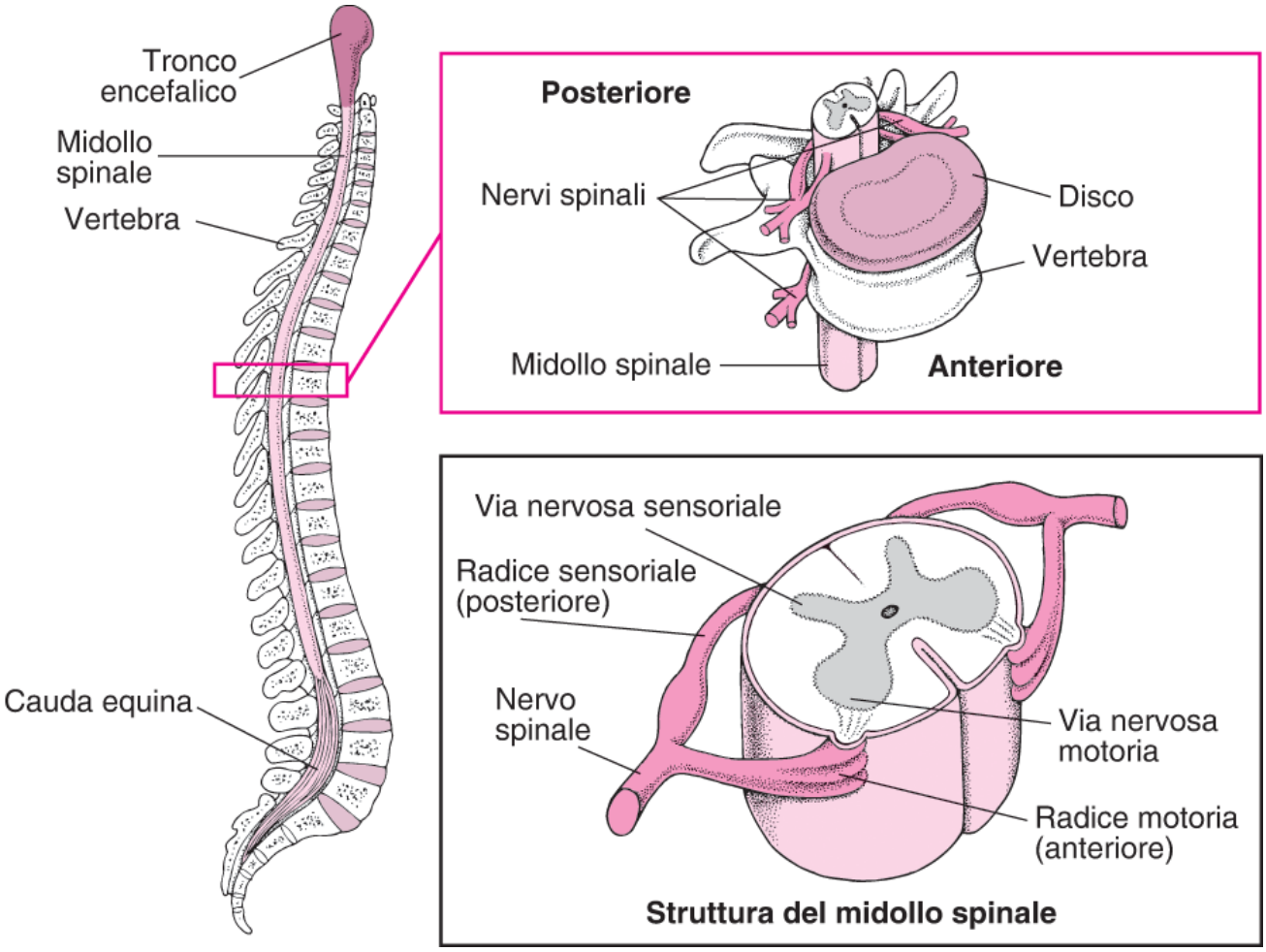


Figura 3: sezione trasversale e struttura anatomica del midollo spinale

Biomateriali

Figura 4: esempi di applicazioni dei biomateriali nell'utilizzo medico

La definizione generica di biomateriale è quel materiale che, date le sue peculiari proprietà, viene impiegato in ambito biomedico (si veda figura 4). È quindi a contatto con l'ambiente biologico in cui è stato inserito, perciò è necessario che questo esplichi la sua azione minimizzando le possibili reazioni avverse o di rigetto.

La proprietà fondamentale che un biomateriale deve presentare per essere definito tale è la biocompatibilità, ovvero la capacità del materiale di non interagire in modo dannoso con l'organismo. A seconda poi del tipo di biomateriale considerato, può essere necessario che tale biomateriale sia biostabile, ovvero che non subisca trasformazioni a causa dell'ambiente biologico (es. protesi all'anca), oppure biodegradabile, ovvero che subisca trasformazioni a causa dell'ambiente biologico che ne determinano dopo un certo intervallo di tempo la totale dissoluzione (es. punti di sutura degradabili).

Non è mai accettabile un biomateriale che sia biotossico, ovvero che arrechi danni all'organismo (es. cadmio), molto spesso si richiede invece come condizione minima che il materiale sia bioinerte, ovvero la proprietà di coesistere nell'ambiente biologico senza causare reazioni avverse in quanto chimicamente e fisicamente stabile (es. titanio). Infine esistono anche materiali bioattivi, ovvero che producono un effetto favorevole sull'organismo (es. biovetri).

Un biomateriale può anche essere bioriassorbibile, ovvero subisce un graduale processo di degradazione ma senza provocare reazioni di rigetto o effetti tossici (es. idrossiapatite). È possibile infine che un materiale bioriassorbibile sia anche bioattivo, ovvero che durante la sua scissione rilasci dei composti chimici che vengano metabolizzati dall'organismo (es. copolimeri acido lattico/acido glicolico).

Quando un generico biomateriale viene progettato, oltre alla biocompatibilità, devono essere considerati:

- l'usura a cui andrà in contro, e quindi la durata che può avere prima che si renda necessaria una sostituzione;
- la contaminazione batterica, ovvero è fondamentale che ci sia sterilità, oltre che in sede operatoria, anche a livello del biomateriale stesso, che deve essere progettato nell'ottica di prevenire al massimo eventuali infezioni successive all'inserimento del biomateriale nel paziente.

I biomateriali sono utilizzati in moltissimi ambiti della Medicina, dalle protesi ossee alle valvole cardiache, e da un punto di vista chimico, hanno uno spettro molto ampio per la loro composizione.
Esistono biomateriali metallici, polimerici e ceramici, tuttavia nella *NTE* sono di importante rilevanza quelli polimerici.
Un polimero è un composto chimico detto macromolecola, composto dall'unione di unità più piccole chiamate monomeri.
Si possono fare varie distinzioni dei polimeri in base a vari criteri:

- origine (sintetici o naturali);
- struttura (omopolimeri, ovvero stesse unità monomeriche, o copolimeri);
- comportamento termico (termoplastici o termoindurenti);
- meccanismi di polimerizzazione (condensazione o addizione).

Il biomateriale che risulta avere il maggiore spettro di applicazioni in ambito di Ingegneria Tessutale Neurale è l'*hydrogel*, che verrà analizzato nel seguente paragrafo, e di cui si farà cenno nell'ultimo capitolo relativo alle applicazioni cliniche sperimentali, insieme all'utilizzo di nanoparticelle appositamente progettate.
Un altro biomateriale degno di nota è il polipirrolo, che presentando delle particolari proprietà, funge da substrato per la crescita di neuroni, di cui si analizzeranno le caratteristiche nella seconda parte relativa ai biomateriali.
Esistono inoltre potenziali applicazioni che verranno trattate successivamente che prevedono l'unione degli *hydrogel* e del polipirrolo per la coltura di cellule staminali mesenchimali, trattate nel paragrafo dedicato al polipirrolo.

1. *Hydrogel*

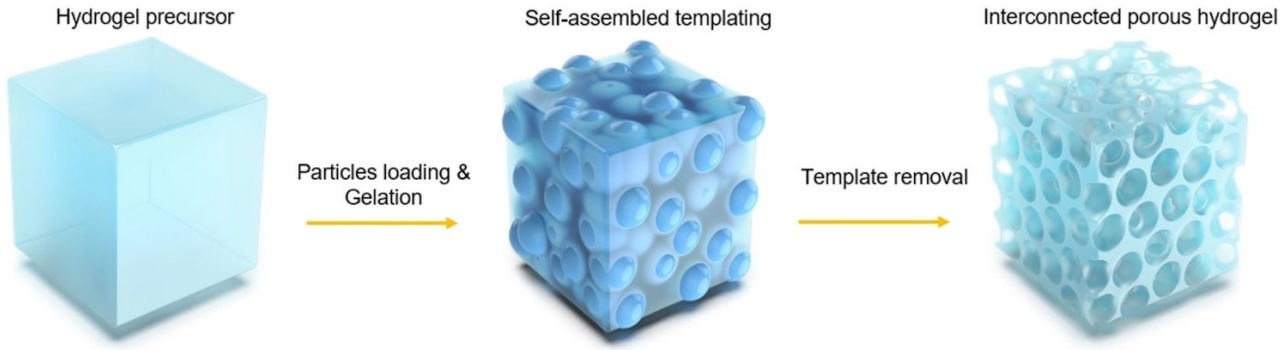
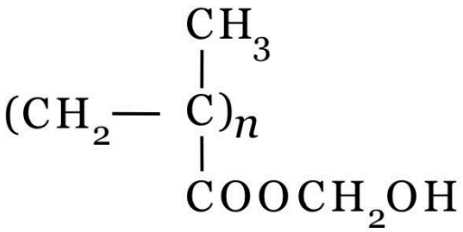


Figura 5: procedimento per ottenere uno *scaffold* di *hydrogel*

Gli *hydrogel* sono una sottoclasse dei polimeri poliacrilici contenenti gruppi ossidrilici -OH nella loro struttura (si veda figura 5).

Un esempio di *hydrogel* è il poliidrossimetilmetacrilato (poli-HEMA), di cui sotto si riporta il monomero.



Una caratteristica peculiare di questi polimeri è la capacità di assorbire elevate quantità d'acqua e di presentare inoltre una buona permeabilità all'ossigeno.

Vengono impiegati commercialmente per la produzione di lenti a contatto, in quanto permettono un'ossigenazione costante del bulbo oculare.

A livello di *NTE*, questi materiali sono largamente utilizzati sia per creare strutture che permettano l'inserimento di cellule staminali a livello intratecale, ma anche di stimolare la crescita del tessuto nervoso.

Grazie alle loro caratteristiche meccaniche, gli *hydrogel* possono essere definiti materiali biomimetici, in quanto hanno la capacità di replicare le proprietà fisiche dei tessuti molli.

Di seguito si riportano nel dettaglio due possibili casi di utilizzo di tale polimero.

1.1. *Hydrogel* utilizzati come *scaffold* per il trapianto di cellule staminali a livello intratecale per l'accesso al midollo spinale

Come detto precedentemente, l'obiettivo di questo tipo di trapianti è quello di ricreare i collegamenti della circuiteria biologica, ovvero il midollo spinale, che sono stati distrutti.
Il midollo spinale è fortemente protetto dal sistema scheletrico e dalle fasce di fibre e muscoli, pertanto l'accesso chirurgico risulta complesso: si ricorre quindi alla somministrazione delle cellule staminali nello spazio intratecale o subaracnoideo (si veda figura 6), ovvero la zona dove scorre il liquido cefalorachidiano o liquor, il quale si trova anatomicamente tra aracnoide e pia madre, due delle tre membrane che costituiscono le meningi, strutture che avvolgono e proteggono il sistema nervoso centrale (encefalo e midollo spinale).
Esistono anche altre vie di accesso, ma la via intratecale rappresenta la più semplice, in quanto è quella sfruttata nelle procedure per le punture lombari.

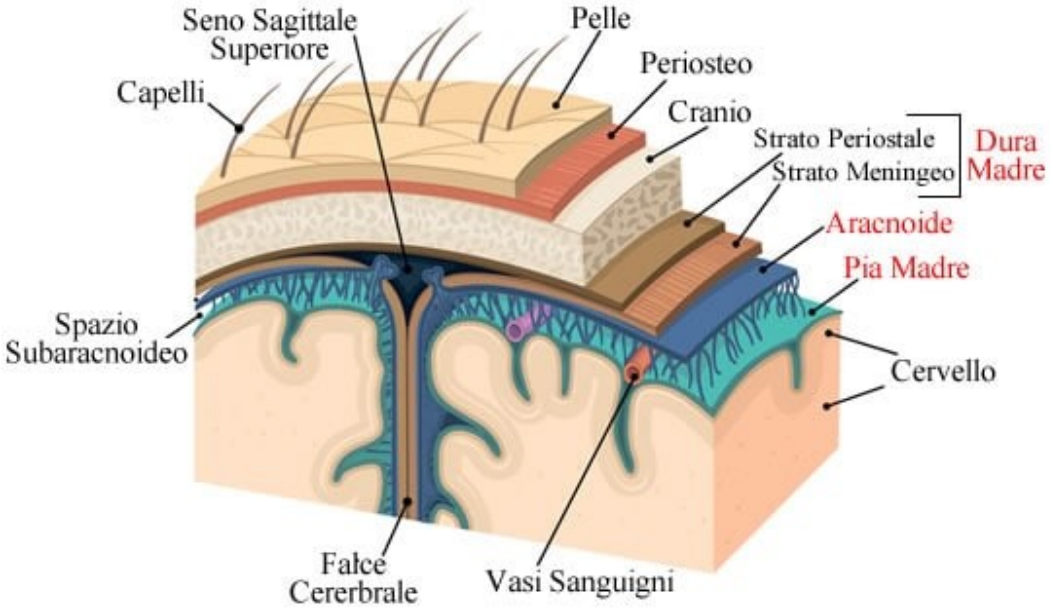


Figura 6: rappresentazione dell'anatomia topografica di encefalo, meningi e cranio

Una volta iniettato l'*hydrogel* in cui sono state inserite le cellule staminali, queste devono migrare attraverso la pia madre e raggiungere il midollo spinale: questa è una caratteristica propria delle cellule che sono ancora indifferenziate, tuttavia nei pazienti di una certa età si riscontra una maggiore difficoltà di attraversamento della pia madre a causa del suo naturale invecchiamento. Questo problema può essere ovviato tramite il posizionamento di specifici enzimi che vanno a degradare parzialmente la matrice extracellulare della pia madre, andando quindi ad attaccare collagene e fibre reticolari.

Lo *scaffold* di *hydrogel* funge quindi da vettore di trasporto temporaneo, che grazie alla sua caratteristica di essere in grado di assorbire una grande quantità d'acqua, presenta delle proprietà meccaniche simili a quelle dei tessuti; inoltre la natura porosa dell'*hydrogel* gli conferisce la capacità di essere un ottimo substrato per l'adesione e la crescita cellulare.

La necessità di utilizzare uno *scaffold* deriva dal fatto che da prove sperimentali si è visto che l'iniezione diretta di cellule staminali determina la loro sedimentazione, che va quindi a rendere inutile l'intero processo.

Oltre ad evitare quindi la sedimentazione, lo *scaffold* permette alle cellule di avere una struttura base su cui avere un appoggio una volta iniettate, e successivamente queste vanno ad interagire con la sequenza RGD (sequenza di 3 aminoacidi, arginina-glicina-acido aspartico) fortemente proadesiva del collagene, che fa parte della matrice extracellulare della pia madre, con la conseguente adesione delle cellule sulla stessa.

Andando quindi ad introdurre gli *hydrogel* che inglobano le cellule staminali, è di fondamentale importanza che la qualità dell'*hydrogel* sia elevata e sia biocompatibile.

L'Ingegneria Chimica permette inoltre di lavorare sulla composizione chimica degli *hydrogel*, andando ad incorporare gruppi funzionali sintetici che vanno a migliorare le proprietà fisiche dell'*hydrogel*, nonché la capacità di trasportare anche enzimi che possano successivamente rendere più semplice l'attraversamento della pia madre da parte delle cellule staminali.

Si registrano infatti alcuni esperimenti su animali in cui gli *hydrogel* funzionalizzati con acido ialuronico e metilcellulosa (HAMC), hanno portato a dei risultati incoraggianti, specialmente nel caso in cui si aggiungano nello *scaffold* dei fattori di crescita.

A tal proposito, a livello umano esiste il *NGF* (*Nerve Growth Factor*), una proteina scoperta dalla scienziata e ricercatrice Rita Levi-Montalcini, per il quale è stata insignita del Premio Nobel per la Medicina nel 1986.

Come precedentemente descritto, gli *hydrogel* sono biomateriali che assorbendo molta acqua risultano morbidi e incapaci di mantenere una forma predefinita. Siccome vengono inseriti all'interno dello spazio dove scorre il liquido cefalorachidiano, le proprietà viscoelastiche e la risposta reologica subiscono un ulteriore peggioramento. Per sopperire perciò a tale decadimento delle proprietà meccano-fisiche, si può ricorrere all'utilizzo di nanoparticelle che fungono da rinforzo e da agente riempiente.

Tali nanoparticelle, che sono tendenzialmente di natura sferica, possono essere funzionalizzate con farmaci fungendo dunque da sistemi di *drug delivery*.

Un esempio sono i dendrimeri, nanoparticelle polimeriche che hanno un'elevata capacità di incapsulamento di molecole come farmaci, andando quindi a ottimizzare il trasporto e il rilascio

specifico e mirato. Oltre ad incapsulare farmaci, i dendrimeri possono svolgere il loro ruolo di *carrier* per ormoni che vanno a regolare l'attività metabolica delle cellule nervose.

Per quanto riguarda i sistemi di *drug delivery*, degni di nomina sono sicuramente i copolimeri di acido lattico/acido glicolico, che essendo bioriassorbibili e bioattivi, possono esplicare l'attività di rilascio controllato e poi essere autonomamente degradati ed espulsi dall'organismo.

Per verificare il corretto posizionamento del catetere intratecale utilizzato poi per immettere gli *hydrogel* si ricorre alla visualizzazione fluoroscopica, tecnica ampiamente utilizzata in Radiologia Interventistica.

Uno dei problemi che si riscontra con l'approccio di iniezione a livello intratecale è che non si può sapere come si disperde l'*hydrogel* una volta all'interno dello spazio compreso tra aracnoide e pia madre. Sono perciò necessari dei sistemi di *imaging* non invasivi che permettano di capire la distribuzione di ciò che viene iniettato, per avere la possibilità di monitorare l'andamento della procedura ed eventualmente ricorrere a degli aggiustamenti in termini di velocità del flusso iniettato (si veda figura 7).

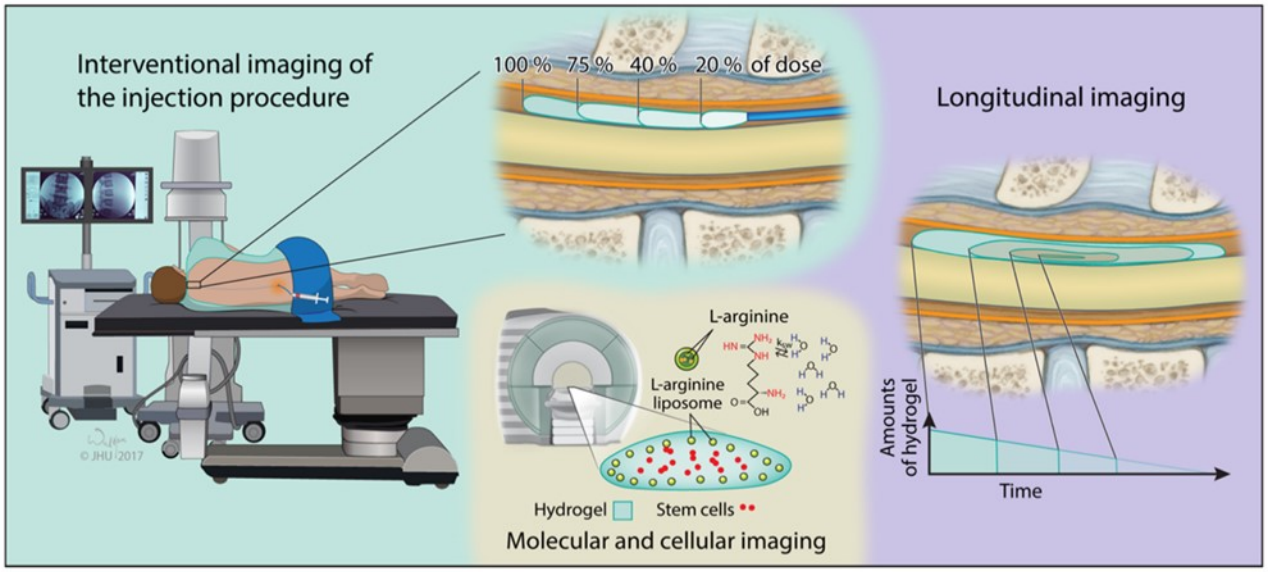


Figura 7: schematizzazione della procedura per l'iniezione dell'*hydrogel* a livello intratecale

Si può ricorrere per l'*imaging* all'utilizzo di agenti di contrasto, che però non devono alterare le proprietà degli *hydrogel* e non devono interferire con le cellule staminali che sono incluse nel biomateriale. Siccome l'iniezione avviene a livello dello spazio intratecale, le tecniche ecografiche o di fluoroscopia non sono utilizzabili, pertanto è necessario ricorrere a tecniche tomografiche come MRI o TAC, in modo particolare è stato osservato che i raggi X sono molto efficaci per monitorare la distribuzione del biomateriale durante l'intera procedura.

Esistono anche nanoparticelle che oltre alla funzione di agente riempitivo dell'*hydrogel*, possono essere utili per l'*imaging*: in questo caso si parla di nanoparticelle multimodali, che permettono la combinazione di più tecniche per le bioimmagini, quali PET, MRI e fluorescenza infrarossa.
Per seguire invece i movimenti delle cellule staminali si può ricorrere alle nanoparticelle di ossido di ferro superparamagnetiche (*SPION*), in quanto se le nanoparticelle in questione vengono legate alle staminali prima del loro inserimento nella struttura porosa dell'*hydrogel*, possono essere utilizzate come sistema di tracciamento degli spostamenti delle cellule staminali.
Un esempio concreto di quest'ultima tecnica di monitoraggio è un esperimento condotto sul cervello di topo affetto dalla malattia del motoneurone in cui erano state inserite cellule fetali umane funzionalizzate con nanoparticelle *SPION*, che ha permesso di scoprire che una volta rilasciate dall'*hydrogel* nel liquor, queste sono migrate e si sono diffuse a livello del quarto ventricolo, che si trova posteriormente al ponte e al midollo allungato, ma anteriormente al cervelletto. Da lì poi sono arrivate al midollo spinale, e la funzionalizzazione con nanoparticelle *SPION* non ha causato alcuna alterazione metabolica o nella capacità di differenziamento delle cellule (si veda l'ultimo capitolo sulla Nanomedicina per altri dettagli relativi agli *SPION*).
Per quanto riguarda l'*imaging* longitudinale, si è sperimentato che le tecniche di tomografia computerizzata permettono la visualizzazione tridimensionale dei tessuti molli e degli *hydrogel*, che possono essere composti ad esempio dal PEG (glicole polietilenico).
In conclusione, uno degli approcci più promettenti è quindi quello che prevede l'utilizzo di nanoparticelle multimodali; le iniezioni intratecali sono altamente raccomandate per il trapianto di cellule staminali, ma è fondamentale l'utilizzo di un biomateriale come l'*hydrogel* sopra descritto in quanto altrimenti si rischia la sedimentazione delle cellule subito dopo il loro inserimento.
Inoltre l'*hydrogel* è un biomateriale in grado di mimare la matrice extracellulare, ha proprietà di adesività e può fungere da *carrier* per nanoparticelle e fattori di crescita che vanno a stimolare il differenziamento e la sopravvivenza delle cellule staminali.

1.2. Sistemi di *hydrogel* applicati all'Ingegneria Tessutale Neurale

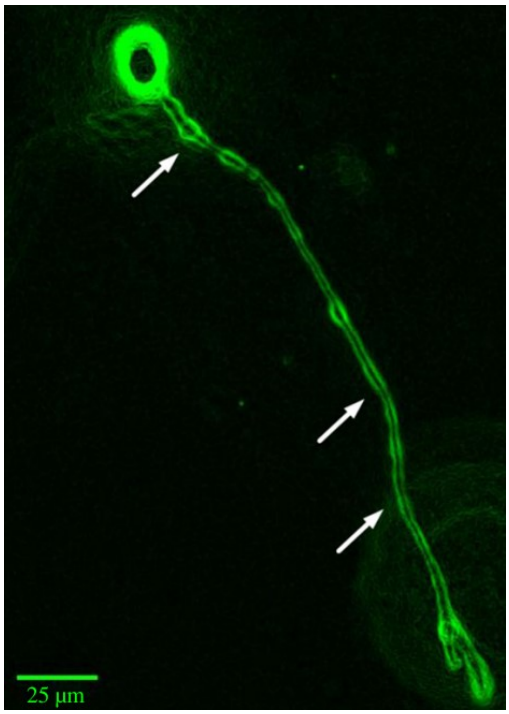


Figura 8: immagine fluorescente ottenuta tramite calceina di un neurone incapsulato in un *hydrogel* con collagene e alginato, le frecce bianche indicano l'estensione dei neuriti verso l'*hydrogel*

Questo paragrafo ha un maggiore focus sulla *NTE*, mentre il paragrafo precedente era più incentrato su un'applicazione concreta a livello del midollo spinale.

Come accennato nella prefazione, scegliere uno *scaffold* per poi includervi le cellule staminali è un passo molto importante per la riuscita dell'obiettivo finale, ovvero quello di promuovere il differenziamento neuronale ma anche delle cellule gliali, così come la crescita assonale a partire dal corpo cellulare dei neuroni (si veda figura 8).

Gli *hydrogel* rappresentano dei validi candidati in tal senso, per le loro proprietà chimiche, fisiche e meccaniche, inoltre la loro struttura porosa permette di inserire altre componenti quali i fattori neurotrofici, composti antagonisti degli inibitori di crescita neuronale e altri agenti che promuovono la crescita neuronale: una volta rilasciati, hanno il compito di stimolare il differenziamento delle cellule staminali.

La rigenerazione del tessuto nervoso a livello del sistema nervoso centrale non avviene anche a causa della presenza di molecole prodotte dalle cellule stesse che inibiscono la rigenerazione neuronale, come ad esempio i proteoglicani condroitina solfato e glicoproteine associate alla mielina. A livello del sistema nervoso periferico si registra invece un maggiore potenziale rigenerativo proprio per l'assenza di fattori di inibizione neuronale.

L'Ingegneria Tessutale Neurale (*NTE*) non si occupa esclusivamente della rigenerazione dei neuroni, ma anche delle cellule gliali non neuronali, che hanno comunque un ruolo fondamentale nella fisiologia della trasmissione dei segnali elettrici.

Perciò quando si progettano le condizioni per un tessuto mimetico ideale, bisogna considerare la possibilità di aggiungere fattori che sostengano e promuovano la crescita neuronale, delle cellule gliali non neuronali e della matrice extra neurale.

Ci sono 4 punti molto importanti che devono essere presi in considerazione:

- la presenza di sistemi di guida che permettano il tracciamento di ciò che si intende somministrare al paziente;
- la presenza di fattori che promuavono l'adesione e la proliferazione cellulare;
- l'eventuale presenza di componenti che fungano da sistemi di rilascio di farmaci e/o ormoni;
- la presenza di una matrice elettricamente conduttiva, cioè un substrato su cui le cellule possano essere sottoposte ad una leggera differenza di potenziale, come avviene in modo naturale nell'organismo.

Gli *hydrogel*, data la capacità di incorporare al loro interno grandi quantità d'acqua, risultano favorevoli per la crescita cellulare (si veda figura 9).

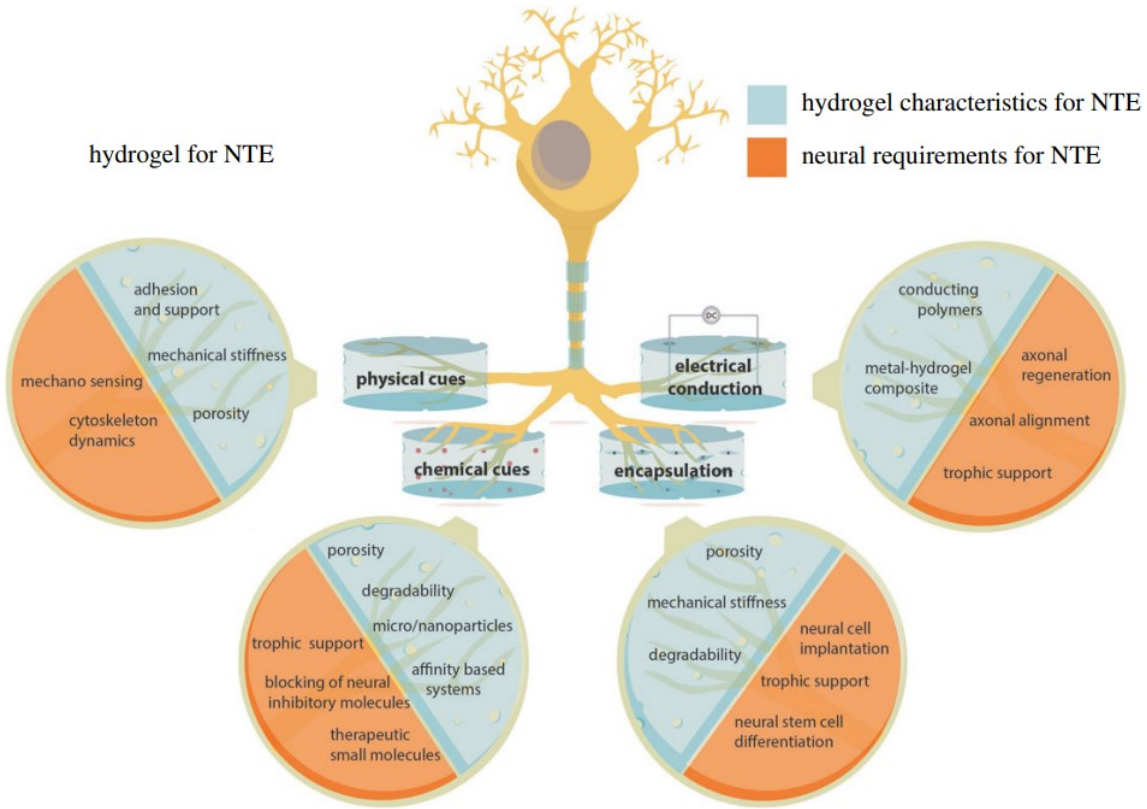


Figura 9: schematizzazione generale che mostra le diverse caratteristiche di un *hydrogel* che possono essere utilizzate per il differenziamento e la crescita neuronale

Gli assoni sono dotati di sistemi di guida micro-topografici che permettono loro di analizzare ciò che li circonda, in modo tale da potersi estendere o ritrarre a seconda che venga percepita o meno una struttura nervosa comunicante (es. dendriti).

A livello cellulare e molecolare, tramite avanzate tecniche di litografia è stato scoperto che la punta dell'assone crescente, chiamata cono di crescita, si estende e segue la direzione delle cellule inserite negli *hydrogel* percependo le proteine extracellulari e le molecole lipidiche: l'assone perciò si allunga e avviene un riarrangiamento strutturale del citoscheletro dell'assone, precisamente dei microtubuli e dei microfilamenti di actina.

In condizioni di danno al midollo spinale o di SLA (in cui si ha una degenerazione degli assoni), gli *hydrogel* si sono dimostrati in grado di promuovere la crescita dell'assone, con una parziale riparazione e recupero delle funzioni.

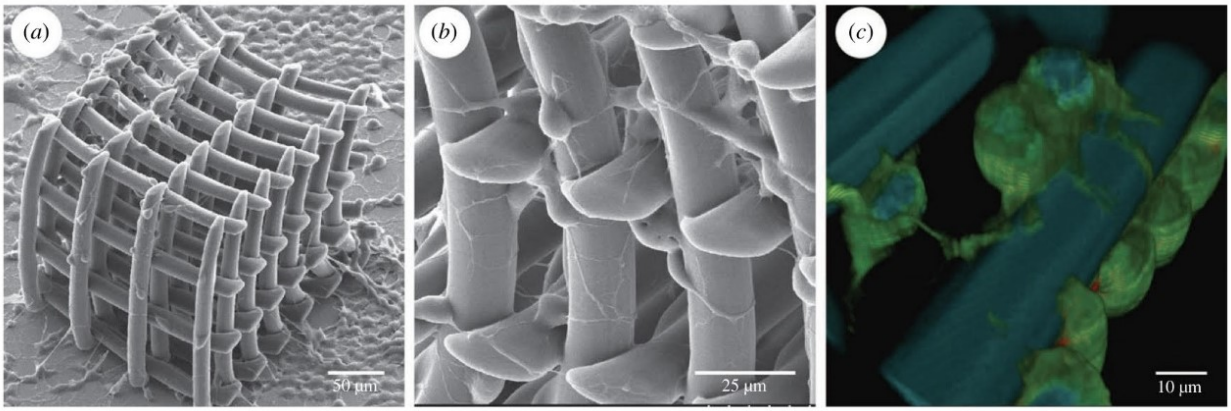


Figura 10: (a, b) immagini al SEM di *hydrogel* composto da PEG; (c) immagine confocale che mostra la presenza di cellule nervose adese sui filamenti di PEG

La crescita assonale dipende primariamente da tre fattori:

- lo stress meccanico a cui viene sottoposta la membrana neuronale;
- la dinamica del citoscheletro neuronale nelle vicinanze dello *scaffold* di *hydrogel*;
- la capacità sensoriale e meccanica dei neuroni di percepire cosa li circonda.

È stato dimostrato che lo stress meccanico influenza in maniera potente lo sviluppo di crescita e direzione dell'assone. Lo stress meccanico, determinato dalle forze interne che spingono sulla membrana a causa dell'attività del citoscheletro, può determinare delle pressioni che si traducono in cambiamenti morfologici dell'assone.

Si è osservato che un aumento della viscoelasticità dell'assoplasma, ovvero il citoplasma dell'assone, causato dalla polimerizzazione dei microfilamenti di actina e dei microtubuli, determina una variazione nella velocità di crescita e nell'allungamento assonale.

Nonostante gli *hydrogel* siano polimeri in grado di assorbire acqua, una volta che inglobano delle cellule, presentano una certa rigidità che da un punto di vista di substrato determina un migliore tasso di sopravvivenza e di proliferazione cellulare, in quanto tali *hydrogel* presentano un modulo elastico molto simile a quello della matrice extracellulare. Infatti è stato visto che gli *hydrogel* più morbidi con un modulo di elasticità maggiore tendono ad indurre un maggiore germogliamento delle cellule nervose rispetto a dei substrati molto rigidi con moduli di elasticità relativamente bassi.
Questo vale per i neuroni, al contrario è curioso il fatto che cellule della nevroglia come gli astrociti, che tra le loro varie funzioni sono deputati a formare la barriera ematoencefalica, dimostrano delle proprietà di adesione che sono in forte contrasto con quelle dei neuroni, e addirittura presentano un maggiore tasso di proliferazione su substrati rigidi.
In un esperimento *in vitro* con cellule staminali neurali su substrati di *hydrogel* 3D di alginato di calcio, si è osservato che una bassa rigidezza (modulo di Young ~ 180 MPa) determina un aumento dell'espressione di un marcatore neuronale (tubulina β-III), ovvero viene stimolata una maggiore trascrizione e traduzione della porzione del genoma cellulare che codifica per tale proteina: ciò implica quindi che vi sia una netta correlazione tra la via di differenziamento che le cellule staminali scelgono e la rigidità dell'*hydrogel*.
Sempre in esperimenti *in vitro*, si è visto che utilizzando come substrato gli *hydrogel* con bassa rigidezza e funzionalizzati con DNA, i neuroni esibiscono una migliore crescita in termini di lunghezza assonale, inoltre si registra un aumento dell'espressione di chinasi per l'adesione focale, proteine che hanno la funzione di percepire lo stress meccanico.
Un'altra interessante osservazione è che nel caso della crescita di cellule nervose adulte, queste hanno una netta preferenza nel proliferare su zone rigide, infatti quando sono state posizionate su un *hydrogel* sintetico di PMMA (polimetilmetacrilato) con dei nano pattern posti nelle cavità, le cellule hanno presentano un'immediata attrazione verso queste zone con modulo di Young basso: il motivo di tale preferenza è però ignoto.
Per quanto riguarda la dinamica del citoscheletro neuronale, questo è composto principalmente da:

- microfilamenti di actina, sottili, flessibili e formati da piccole proteine di actina, si trovano subito al di sotto della membrana plasmatica, hanno una funzione di stabilizzazione della membrana e di binario di trasporto: la crescita neurale è proprio in funzione dell'accorciamento e allungamento dei microfilamenti di actina, che variano in lunghezza tramite meccanismi di polimerizzazione e depolimerizzazione dinamici;
- microtubuli, sono dei tubi cilindrici cavi formati da due proteine, tubulina-α e tubulina-β, presentano una rigidezza strutturale notevolmente superiore rispetto ai microfilamenti di actina, infatti tra le loro tante funzioni c'è anche quella di resistere a forze di compressione;
- proteine neurofilamentose (filamenti intermedi).

Di seguito si può osservare la tabella 1 che mette in correlazione il tipo di materiale di cui l'*hydrogel* è composto e le sue proprietà, il tipo di cellula e le osservazioni in merito alla reciproca interazione.

hydrogel material	cell type	hydrogel property	observation
alginate–calcium 3D scaffolds	neural stem cells	elastic modulus (alteration in cross-linking density)	hydrogel with modulus of 180 Pa showed a 20-fold increase in β-III tubulin expression
polyacrylamide with laminin	retinal ganglion cell axons	shear modulus (0.1 kPa and 1 kPa)	axons grow towards the soft substrate
polyacrylamide gel bi-functionalized with poly-lysine and laminin motif IKVAV	embryonic and adult neural progenitor cells	gel stiffness (2 kPa and 0.2 kPa)	increased adhesion, maturation and neurogenesis
polyacrylamide gel with PDL coating	hippocampal neurons	substrate stiffness altered	stiffer substrates suppressed neuritogenesis
PMMA-coated silicon wafers	adult sympathetic and sensory ganglia	the presence of multiple ridges/grooves in the hydrogel matrix	axon projections guided towards hydrogel ridges
polyacrylamide or fibrin gels	cortical neurons and astrocytes	substrate stiffness altered	neural sprouting observed on softer gels, astrocyte attachment on stiffer gels
DNA strands covalently linked to polyacrylamide hydrogel	neurons and glia	substrate stiffness altered	neural sprouting observed on softer substrates
polyacrylamide hydrogel with (GAG) binding peptide	human pluripotent stem cells	substrate stiffness altered	softer substrates enhanced neuronal differentiation
methacrylate-modified hyaluronic acid (multi-layer)	human iPSC-derived neural progenitor cells	3D culture system and varying elastic moduli	neuronal differentiation enhanced in soft culture systems

Tabella 1: *hydrogel* capaci di fornire spunti di guida fisica per la crescita dei neuriti

La rigidezza meccanica assonale dipende dalla reticolazione tra microfilamenti di actina e microtubuli: durante l'avanzamento neuronale, il meccanismo di polimerizzazione e depolimerizzazione dinamico genera delle forze meccaniche a livello del citoscheletro che determinano l'assemblamento di strutture ibride composte da actina e microtubuli; inoltre tali forze vanno a determinare la crescita e la direzione verso cui l'assone si protende.

Un altro fatto degno di nota è che i microfilamenti di actina esibiscono un ordito a maglia circonferenziale più grande quando le cellule nervose sono cresciute su una superficie di *hydrogel* che abbia un modulo di Young (modulo di elasticità longitudinale) comparabile a quello del tessuto cerebrale ($1.7 \pm 0.3 \times 10^2$ MPa), e nelle medesime condizioni si ha anche un maggiore allungamento del cono di crescita dell'estremità assonale.

È stato osservato che la presenza di proteine come le integrine e le caderine legate sulla superficie dell'*hydrogel* determinano una maggiore adesione dei neuriti (specialmente degli assoni), e ciò influenza la dinamica dei microfilamenti di actina.

In studi recenti si è potuto constatare che se le cellule staminali neuronali vengono incapsulate in un *hydrogel* di poliacrilamide funzionalizzato con glicosamminoglicani (GAG, che fanno parte della naturale composizione della matrice extracellulare), allora le cellule vengono indotte al differenziamento proprio grazie al substrato.

Sempre in studi recenti si è osservato che le cellule embrionali e le cellule progenitrici neuronali derivate da neuroni adulti hanno una naturale tendenza ad aderire e a procedere con il differenziamento se vengono incluse in un *hydrogel* funzionalizzato con poli-lisine e laminine (glicoproteine) che presenta un modulo elastico simile a quello del tessuto nervoso fisiologico.

Come anticipato prima, i neuroni sono dotati di capacità di meccano-rilevamento, ovvero sono in grado di convertire una forza pressoria in un segnale biochimico grazie alla presenza di canali ionici specializzati che sono meccanicamente attivati.

Nel caso in cui la pressione che il neurone percepisce è particolarmente elevata, il citoscheletro subisce delle deformazioni, da cui consegue il collasso del cono di crescita assonale e un arretramento dei neuriti (assone e dendriti): si ritiene che questo meccanismo sia dovuto all'aumento della concentrazione intracellulare degli ioni calcio Ca^{2+}.

Un'altra importante applicazione intrinseca degli *hydrogel*, non propria della *NTE* ma che può essere di grande aiuto, è la capacità di espletare un rilascio controllato di biomolecole dallo *scaffold* inserito, siano essi farmaci, fattori neurotrofici o ormoni.

È infatti possibile preventivamente incorporare nella matrice di *hydrogel* biomolecole esogene, le quali vengono rilasciate in modo graduale, all'inizio per semplice diffusione e poi per progressiva erosione della superficie dello *scaffold*, fino a degradare l'intera struttura (questo processo avviene grazie ad enzimi presenti nell'organismo, oppure ad enzimi che vengono immessi in piccole quantità insieme nello *scaffold*).

Di seguito viene proposta la tabella 2 che presenta le principali molecole che hanno un interesse nell'essere immesse nell'organismo con un meccanico a rilascio controllato.

hydrogel	drug/factor	injury model	mode of delivery	outcome
PLA-b-PEG-b-PLA	NT3	spinal cord injury (T8 segment)	injection at the lesion cavity	enhanced axonal growth
poly-L-ornithine-coated alginate	BDNF-secreting fibroblast cells	spinal cord injury (C4 segment)	graft placement	functional recovery of forelimb and hindlimb
fibrin conjugated with heparin	NGF, BDNF or NT3	*in vitro* study	*in vitro*	prolonged release of trophic factors; neurite extensions observed
fibrin conjugated with heparin	NT3	spinal cord injury (T9 segment)	graft implants	increase in neural fibre density
hyaluronan and methylcellulose	EGF or PEG-EGF	stroke	epi-cortical graft implant	enhanced proliferation of neural stem/progenitor cells
fibrin	chondroitinase ABC	spinal cord injury (C4 segment)	graft implant adjacent to the lesion	decrease in glycosaminoglycan
fibrin	GDNF	—	*in vitro*	enhanced neurite extensions
fibrin	heparin-immobilized NGF	sciatic nerve transection	conduit implant	axon regeneration observed
fibrin	NT3	spinal cord injury (T9 segment)	graft implant	neuronal fibre sprouting but no functional recovery
hyaluronic acid	Nogo-66 receptor antibody	—	*in vitro*	pH-dependent release of antibody
hyaluronic–poly-L-lysine	anti-NgR	spinal cord injury (T8–T9 segment)	implant	axon extensions towards HA-PLL/anti-NgR hydrogel

Tabella 2: *hydrogel* per il rilascio di molecole terapeutiche in *NTE*

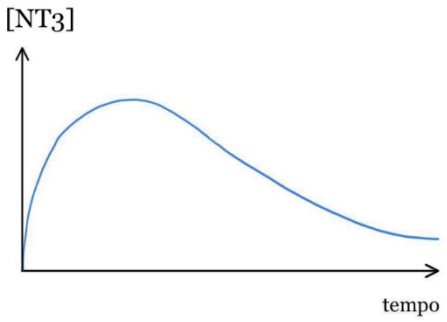
Per quanto riguarda il rilascio di fattori neurotrofici, questi hanno una particolare rilevanza nella *NTE* in quanto è risaputo che i fattori neurotrofici sono essenziali per la regolazione e la promozione della crescita, nonché la proliferazione e la sopravvivenza delle cellule nervose.

Di seguito si elencano i fattori neurotrofici più importanti:

- *NGF* (Fattore di Crescita Nervoso);
- *BDNF* (Fattore Neurotrofico derivato dall'encefalo);
- *GDNF* (Fattore Neurotrofico derivato dalle cellule gliali);
- *CNTF* (Fattore Neurotrofico Ciliare).

Gli *hydrogel* rappresentano una via semplice per il rilascio di tali fattori neurotrofici nella regione d'interesse.

Un esempio concreto è rappresentato dalla formulazione di *hydrogel* costituita da acido poli-lattico (*PLA*) e glicole polietilenico (PEG), il quale è utilizzato per il rilascio della neurotrofina-3 (NT3): in questo caso si ha un forte rilascio iniziale, seguito da un rilascio prolungato molto più lento, che contribuisce positivamente alla crescita neuronale.
Il grafico sotto mostra sommariamente l'andamento della concentrazione di NT3 al progredire del tempo.



Oltre alla possibilità di rilasciare fattori neurotrofici che stimolano e coadiuvano la rigenerazione del tessuto nervoso, si può anche intervenire nel rilascio di fattori che vadano a bloccare gli inibitori della rigenerazione neurale. Infatti in seguito ad una lesione a livello gliale, il tessuto danneggiato viene sostituito da tessuto connettivo cicatriziale, che rappresenta uno dei maggiori impedimenti per la rigenerazione assonale. Perciò l'idea alla base di questo approccio è quello di incapsulare all'interno degli *hydrogel* dei fattori che vanno ad inibire la formazione di tessuto cicatriziale.
Nel caso di danno a livello di nervi o di lesioni a livello del midollo spinale, si sta studiando la possibilità di utilizzare un enzima batterico (ChABC, condroitinasi ABC) che degrada le catene di GAG legate ai proteoglicani, in modo da ridurre la concentrazione di GAG e sfavorire la formazione di tessuto cicatriziale.
In un altro studio si è tentato un approccio che combinasse sia la presenza di un fattore neurotrofico stimolante come NT3, sia la presenza di un agente che bloccasse l'inibizione della rigenerazione come ChABC. Sono stati entrambi inseriti in un *hydrogel* composto da agarosio, e si è testata l'efficacia *in vitro* simulando un modello di lesione del midollo spinale, con risultati promettenti che hanno apportato un miglioramento della capacità di rigenerazione assonale. Ciò ha generato delle prospettive che *in vivo* porterebbero a pensare ad un parziale recupero delle funzioni motorie.
Gli *hydrogel*, come accennato prima, possono essere utilizzati anche per il rilascio di farmaci, ad esempio nel caso di antitumorali contro il glioblastoma multiforme, neoplasia cerebrale molto aggressiva che risulta difficile da curare.
La ratio alla base di questo approccio è che la presenza nell'*hydrogel* di un chemioterapico, rilasciato in modo controllato, determina il mantenimento costante della concentrazione del farmaco nell'area dove l'*hydrogel* è stato posizionato.

Questo sistema di procedere presenta due benefici:

- prevenire la ricorrenza del tumore;
- ridurre la tossicità sistemica dell'approccio chemioterapico per via endovenosa, in quanto l'antitumorale viene rilasciato in modo lento solo nella zona interessata dalla neoplasia.

È quindi fondamentale avere un sistema di *drug delivery* che possa rilasciare l'antitumorale per un periodo prolungato di tempo, come ad esempio l'*hydrogel* iniettabile composto da polietilen glicole dimetacrilato (PEG-DMA), il quale viene caricato con l'agente chemioterapico necessario.

A seconda quindi di cosa si vuole rilasciare e in base alla lunghezza del periodo durante il quale si vuole che il rilascio avvenga, bisogna aggiustare la composizione chimica dell'*hydrogel*, la cui velocità di degradazione può variare a seconda dei trattamenti a cui viene sottoposto prima di essere utilizzato come *carrier*.

Per quanto concerne invece l'incapsulamento delle cellule nell'*hydrogel*, l'idea alla base è quella di inserire cellule che producano molecole che vadano a stimolare la rigenerazione neurale oppure cellule che sostituiscano le cellule morte o lesionate.

Una recente ricerca ha registrato che tramite l'utilizzo di un *hydrogel* di PEG funzionalizzato con 4-dibenzocicloottinolo e legato a laminine e interferone-γ (citochina prodotta dai linfociti B e T), il differenziamento da cellule staminali neurali a neuroni funzionanti è fortemente facilitato.

Un'altra possibile via per favorire il differenziamento è quella di utilizzare peptidi auto-aggreganti (*SAP*), infatti si è visto in un esperimento *in vitro* che se le cellule staminali vengono incorporate all'interno di un *hydrogel* funzionalizzato con *SAP*, si ha un'eccellente proliferazione cellulare e la formazione di sinapsi tra le cellule; si è poi trasportato questo esperimento *in vivo*, con risultati positivi che prevedono anche una risposta infiammatoria molto lieve.

Una delle problematiche evidenziate nell'utilizzo di *SAP*, e che deve essere debitamente approfondita, è l'eventuale risposta immunitaria contro questi peptidi esogeni che l'organismo potrebbe riconoscere come *non-self*, generando quindi una risposta immunitaria contro tali *SAP*.

2. Polipirrolo e altri materiali elettricamente conduttivi

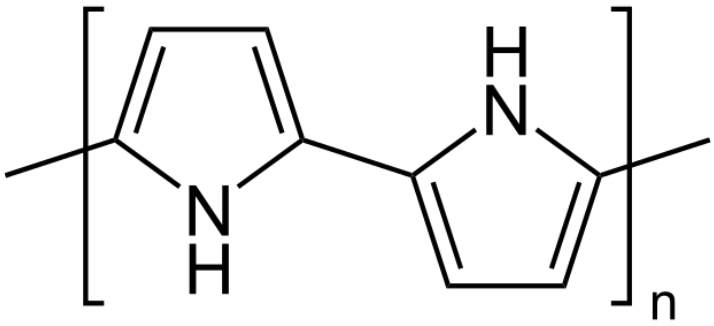


Figura 11: struttura chimica del polipirrolo

Si tratta di un polimero costituito dal monomero pirrolo, una molecola con struttura furanosica ma che al posto dell'ossigeno presenta un atomo di azoto.
La caratteristica peculiare di tale polimero è il fatto di essere in grado di condurre corrente elettrica, e, proprio per questo motivo, rappresenta il substrato ideale su cui i neuroni possono crescere.
L'applicazione di una debole corrente elettrica determina il raddoppio di crescita di tessuto nervoso rispetto ad un substrato elettricamente inerte a parità di tempo di incubazione, in quanto ricrea le condizioni elettro-fisiologiche in cui le cellule nervose si trovano normalmente nell'organismo.
Esperimenti *in vitro* e *in vivo* hanno dimostrato che l'applicazione di una differenza di potenziale (5-20 V) induce una corrente depolarizzante, la quale ha un effetto di stimolazione per la rigenerazione e la ramificazione degli assoni di cellule che hanno subito un danno.
I relativi meccanismi molecolari non sono completamente conosciuti, tuttavia si ritiene che i canali ionici voltaggio-dipendenti del calcio Ca^{2+} e il rilascio di fattori neurotrofici, che avviene su stimolazione elettrico-dipendente, abbiano sicuramente un ruolo importante.
Gli *hydrogel* ibridi presentano nella maggioranza dei casi una componente conduttiva e una non conduttiva: questa struttura può essere generata a partire da una polimerizzazione chimica o elettrica del monomero conduttore (es. pirrolo) all'interno dell'*hydrogel* già prefabbricato oppure combinando il polimero conduttivo con una polimerizzazione elettro-chimica dei monomeri dell'*hydrogel*, così da costruire l'*hydrogel* attorno al polimero conduttivo.
Un esempio concreto ha visto l'utilizzo di un *hydrogel* composito, formato da PEG e un nano filamento di argento, il quale ha dimostrato di avere buone proprietà fisico-elettriche determinando una maggiore crescita dei neuriti. L'applicazione esterna di una differenza di potenziale (5-20 V) ogni 2 ore per un periodo di 6 giorni ha permesso di avere una maggiore crescita dei filamenti neuritici e una loro maggiore diramazione rispetto alle stesse condizioni sperimentali, ma senza la differenza di potenziale applicata.

Il polipirrolo è anche in grado di stimolare la crescita delle cellule gliali; nello specifico svolge un ruolo di grandissima importanza la possibilità di far crescere e proliferare le cellule di Schwann in *hydrogel* contenenti il polipirrolo, in quanto da un punto di vista biologico le cellule di Schwann sono quelle che formano la guaina mielinica nel sistema nervoso periferico.
Per i motivi già spiegati nel capitolo sulla biologia e fisiologia del tessuto nervoso, la prospettiva di poter crescere tali cellule rappresenta una possibile cura a tutte quelle malattie neurodegenerative che prevedono il progressivo deterioramento dello strato mielinico fondamentale per il corretto funzionamento della conduzione dello stimolo nervoso.
Un esperimento che ha coinvolto un *hydrogel* con polipirrolo e cellule di Schwann ha mostrato che la presenza di un campo elettrico per 4 ore porta ad un incremento nella produzione di *NGF* e *BDNF*, oltre ad un aumento del trascrittoma (mRNA) che implica la produzione di proteine utili per la crescita delle cellule.
Degni di citazione come materiali elettricamente conduttivi sono i nanotubi di carbonio (*CNT*), in quanto dotati di proprietà semiconduttive che li rendono ottimi candidati insieme al polipirrolo. Nei *CNT* (si veda figura 12) gli atomi di carbonio sono ibridati sp^2 e questo determina che un elettrone rimanga libero e permetta ai nanotubi di essere dei buoni conduttori. I *CNT* sono infine biocompatibili e hanno un ampio utilizzo nel settore della ricerca di sistemi di *drug delivery*, perciò potrebbero essere incapsulati negli *hydrogel* anche con il fine del rilascio controllato di un farmaco.

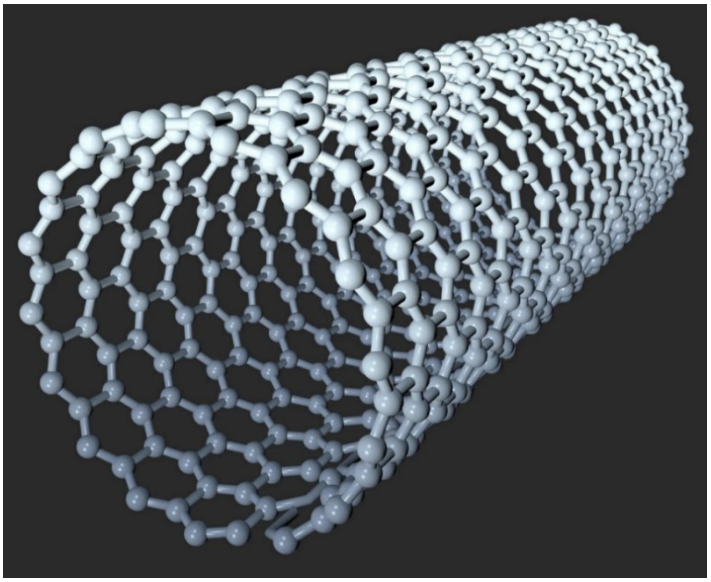


Figura 12: struttura atomica dei nanotubi di carbonio

Ultimo argomento degno di nota sono i recenti sviluppi dei dispositivi neuromodulatori: infatti gli *hydrogel* ibridi con polipirrolo sono stati utilizzati in fase ancora sperimentale per il rivestimento degli elettrodi utilizzati nell'EEG, in quanto permettono una riduzione dell'impedenza d'elettrodo e quindi una migliore registrazione del segnale elettroencefalografico.

2.1. *Hydrogel* ibridi polipirrolo/alginati (*PPy/Alg hydrogel*)

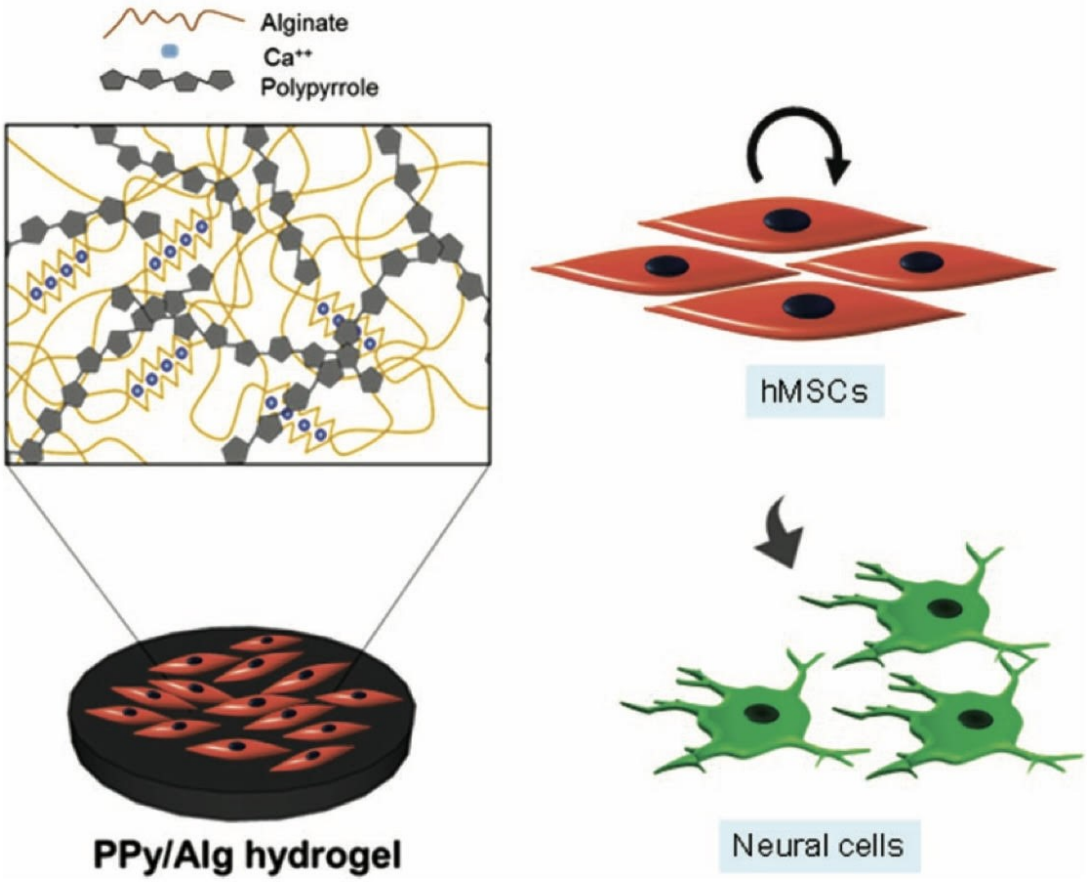


Figura 13: sommaria illustrazione del principio alla base di *PPy/Alg hydrogel*

Un'applicazione molto interessante del polipirrolo è quella che prevede l'utilizzo di *hydrogel* ibridi funzionalizzati con polipirrolo e alginati per la coltura di cellule staminali mesenchimali umane (*hMSCs*), che rappresentano un biomateriale di consistenza morbida ma con la proprietà importantissima di essere elettricamente conduttivo; tali *hydrogel* hanno anche possibili applicazioni in *NTE* (si veda figura 13).

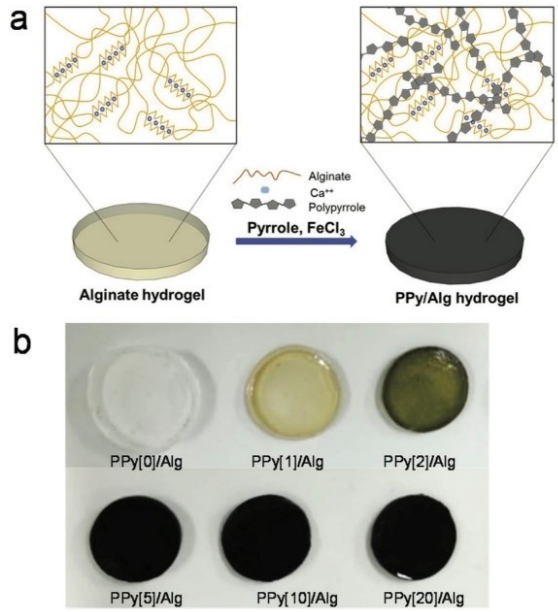
Come già detto, l'unione di un *hydrogel* con il polipirrolo rappresenta uno dei migliori prototipi artificiali che vanno a ricreare l'ambiente tipico in cui il le cellule nervose si trovano normalmente, in quanto viene ricreato l'ambiente elettricamente carico del tessuto nervoso.

Gli *hydrogel* ibridi di polipirrolo e alginato (*PPy/Alg hydrogel*) sono ottenuti tramite polimerizzazione chimica del polipirrolo, reticolato ionicamente con un supporto filamentoso e intricato di alginato che costituisce la matrice base dell'*hydrogel*.

PPy/Alg hydrogel presentano un modulo di Young di circa 20-200 kPa. La capacità di condurre elettricità del *PPy/Alg hydrogel* è superiore di un ordine di grandezza rispetto all'*hydrogel* composto solamente da alginato.

Esperimenti *in vitro* utilizzando cellule staminali mesenchimali derivate da midollo osseo umano (*hMSCs*) hanno dimostrato un'ottima adesione e crescita sul substrato di *PPy/Alg hydrogel*.
Inoltre grazie a tale substrato si è registrato un forte aumento nella produzione di marcatori per il differenziamento neurale (es. *Tuj1* e *MAP2*) rispetto alle colture cellulari di controllo *l'hydrogel* di alginato senza il polipirrolo.
Esperimenti *in vivo* invece hanno dimostrato che, dopo 8 settimane di impianto del composto, si osserva una leggera reazione infiammatoria, che però può essere controllata farmacologicamente.
PPy/Alg hydrogel rappresentano quindi dei biomateriali morbidi e conduttivi, molto simili quindi al tessuto nervoso naturale che si trova negli organismi: queste somiglianze meccaniche ed elettriche indicano questo substrato come un ottimo sistema per indurre il differenziamento e la proliferazione di cellule neurali, con vaste applicazioni quindi in *NTE*.
Le cellule staminali mesenchimali umane (*hMSCs*) possiedono la capacità di autorigenerarsi e di differenziarsi in più linee cellulari, come ad esempio condrociti, osteoblasti, adipociti, cellule neurali e cardiomiociti. Grazie a queste capacità e ad una bassa immunogenicità, queste cellule sono largamente studiate per applicazioni come gli organi artificiali e la rigenerazione di tessuti danneggiati o malati.
Studiando approfonditamente le caratteristiche delle cellule staminali mesenchimali umane (*hMSCs*) si è scoperto che il loro comportamento è influenzato dalla presenza di segnali elettrici esterni, fattore che ha spinto la ricerca di materiali elettricamente conduttivi su cui far proliferare tali cellule, dato che un ambiente elettricamente carico favorisce il differenziamento verso la linea cellulare neuronale.
Un fattore importante da considerare nella progettazione di un biomateriale elettricamente conduttivo, che deve fungere da substrato per la crescita di cellule staminali, sono le proprietà meccaniche, le quali rivestono un ruolo fondamentale nella proliferazione cellulare.
È stato scoperto che la propensione per il differenziamento cellulare delle cellule staminali mesenchimali umane (*hMSCs*) può essere modulata cambiando l'elasticità del substrato su cui le cellule vengono seminate.
Gli *hydrogel* conduttivi come *PPy/Alg hydrogel* presentano proprietà meccaniche ed elettriche adeguate sia per creare *scaffold* che vadano ad interagire con tessuti molli (materiali biomimetici) ma anche per produrre bioelettrodi specifici per il tessuto nervoso.
Nello specifico, la ricerca si è focalizzata verso i *PPy/Alg hydrogel* in quanto il polipirrolo è un polimero conduttivo organico biocompatibile con alte capacità di condurre la corrente elettrica e facilità di sintesi; l'alginato è un polisaccaride naturale che è stato ampiamente utilizzato per produrre gli *hydrogel*, in quanto in presenza di ioni bivalenti come il calcio Ca^{2+} e il bario Ba^{2+}, l'alginato reticola e forma la struttura porosa di fibre intricate tipiche degli *hydrogel*.

Per la sintesi di *PPy/Alg hydrogel* ibridi è necessaria la presenza di un agente ossidante come il cloruro ferrico ($FeCl_3$): qui di seguito si possono osservare le diverse composizioni possibili di *PPy/Alg hydrogel* al variare delle concentrazioni di polipirrolo e di $FeCl_3$ (si veda figura 14).



Sample	[Pyrrole]	[$FeCl_3$]
PPy[0]/Alg	0×10^{-3} M	0×10^{-3} M
PPy[1]/Alg	1×10^{-3} M	2.5×10^{-3} M
PPy[2]/Alg	2×10^{-3} M	5×10^{-3} M
PPy[5]/Alg	5×10^{-3} M	12.5×10^{-3} M
PPy[10]/Alg	10×10^{-3} M	25×10^{-3} M
PPy[20]/Alg	20×10^{-3} M	50×10^{-3} M

Figura 14: variazione di colore e consistenza degli *hydrogel* al variare delle concentrazioni di polipirrolo e di $FeCl_3$

Studiando i meccanismi di reazione tra polipirrolo e alginato, si è osservato che l'alginato carico negativamente funge da dopante e interagisce elettrostaticamente con gli oligopolimeri di polipirrolo, fenomeno che contribuisce ulteriormente alla stabilità meccanica e strutturale del *PPy/Alg hydrogel*. Come si può osservare dalla tabella della figura 14, quando la concentrazione del polipirrolo è eccessivamente elevata (*PPy[20]/Alg*), si formano aggregati in soluzione esterni alla struttura dell'*hydrogel*, che aderiscono in modo molto debole alla superficie dell'*hydrogel* e si staccano facilmente, perciò *PPy[20]/Alg hydrogel* è stato escluso dai successivi studi come scaffold per le colture cellulari.

La struttura chimica dei vari *PPy/Alg hydrogel* ottenuti è stata analizzata tramite spettroscopia infrarossa a riflettanza totale attenuata (ATR-IR), da cui si è notato che all'aumentare della concentrazione di polipirrolo, i picchi spettroscopici hanno un valore sempre maggiore.

Inoltre l'analisi tramite ATR-IR ha dimostrato che il contenuto di polipirrolo incorporato dall'*hydrogel* aumenta all'aumentare delle concentrazioni del monomero pirrolo e dell'agente ossidante.

Si è proceduto anche all'analisi dei vari *PPy/Alg hydrogel* tramite SEM (microscopio elettronico a scansione), che ha rivelato la presenza di strutture di interconnessione microporose in tutti i campioni di *hydrogel*.
Immagini al SEM di *PPy[5]/Alg hydrogel* e *PPy[10]/Alg hydrogel* hanno mostrato la presenza di fiocchi di polipirrolo nella matrice, dovuta alla concentrazione medio-alta di polipirrolo.
Immagini al SEM di *PPy[20]/Alg hydrogel* hanno mostrato degli aggregati di grandi dimensioni di polipirrolo dovuti all'elevata concentrazione di polipirrolo, che ne determina l'incapacità di utilizzo come substrato efficacie.
Per valutare le proprietà meccaniche dei vari *PPy/Alg hydrogel* si è utilizzato un reometro, strumento che permette di analizzare il comportamento fisico di soluzioni polimeriche.
È stato osservato che le proprietà meccaniche degli *hydrogel* di alginato possono essere modificate cambiando la concentrazione dell'alginato e la densità delle reticolazioni.
Nel caso di *hydrogel* compositi come il *PPy/Alg hydrogel*, le interazioni elettrostatiche che si vanno ad instaurare tra il polipirrolo carico positivamente e l'alginato carico negativamente possono promuovere la stabilità meccanica e strutturale in quanto si instaura un'attrazione elettrostatica.
Procedendo nello studio delle varie formulazioni di *PPy/Alg hydrogel*, è stato visto che in generale l'aumento di concentrazione del polipirrolo determina un miglioramento della conduttività.
Tuttavia, come accennato sopra, oltre un certo limite di concentrazione di polipirrolo e agente ossidante si ottiene un prodotto fragile ed eterogeneo con depositi di polipirrolo sulla superficie dell'*hydrogel*.
Inoltre è stata constatata una relazione stretta tra proprietà meccaniche e proprietà elettriche: infatti all'aumentare della concentrazione di polimeri conduttivi come il polipirrolo, aumenta sia la conduttività sia il modulo di Young dell'*hydrogel* ibrido.
Dopo aver studiato nel dettaglio le caratteristiche fisico-chimiche di *PPy/Alg hydrogel*, si è proceduto alla sperimentazione *in vitro* seminando le cellule staminali mesenchimali umane (*hMSCs*), da cui si è evidenziata una buona adesione cellulare sul substrato conduttivo.
Dopo 4 ore dalla semina, il *PPy[10]/Alg hydrogel* è stata la formulazione chimica che ha registrato il maggior numero di cellule adese alla propria superficie. Inoltre *PPy[10]/Alg hydrogel* presenta una topografia e una struttura che sembrano essere il perfetto connubio di rigidezza e conduttività.
Studi successivi si sono incentrati sul differenziamento neurale delle cellule staminali mesenchimali umane (*hMSCs*) su *PPy[10]/Alg hydrogel* indotto tramite il trattamento con acido retinoico. Nonostante le cellule staminali non siano elettrofisiologicamente attive, presentano dei marcatori neurali essenziali, la cui espressione è stata aumentata durante l'induzione al differenziamento.
Dopo un periodo di incubazione di 7 e 14 giorni sono state prelevate le cellule e colorate tramite trattamento immunoistochimico, che ha permesso di rilevare un'elevata presenza di marcatori per il

differenziamento neurale (es. *Tuj1*), mentre il *PPy[0]/Alg hydrogel* non è stato in grado di permettere il differenziamento e la crescita cellulare a causa della bassa adesione cellulare che tale substrato ha fornito alle cellule staminali.

Si è proceduto al prelievo delle cellule cresciute su *PPy[10]/Alg hydrogel* e si è effettuata un'analisi genetica del trascrittoma tramite RT-PCR (reazione a catena della polimerizzazione di trascrizione inversa in tempo reale) per i marcatori *Tuj1* e *MAP2*: il risultato di tale analisi ha evidenziato che le cellule seminate su *PPy[10]/Alg hydrogel* mostravano alti livelli di mRNA per tali marcatori, indicando quindi *PPy[10]/Alg hydrogel* come substrato migliore per facilitare il differenziamento neurale delle cellule staminali mesenchimali umane (*hMSCs*).

Infatti anche da un punto di vista meccanico, *PPy[10]/Alg hydrogel* presenta delle caratteristiche di rigidezza e duttilità simili al tessuto nervoso, perciò spinge le cellule staminali verso la linea cellulare neurale, mentre ad esempio un substrato rigido indurrebbe le cellule staminali su una linea cellulare di osteogenesi.

La stimolazione elettrica esterna può essere ulteriormente fornita per facilitare il differenziamento e modulare l'elettrofisiologia cellulare delle cellule differenziate in procinto di diventare mature.

Questo fatto rimarca l'importanza di utilizzare un substrato in grado di condurre corrente elettrica.

I prossimi studi chiariranno come la stimolazione elettrica abbia un effetto nel promuovere il differenziamento.

Necessiterà di approfondimento anche l'utilizzo di cellule staminali pluripotenti indotte al fine di poter capire come si comportano ed in caso aggiustare il protocollo sulle loro particolarità.

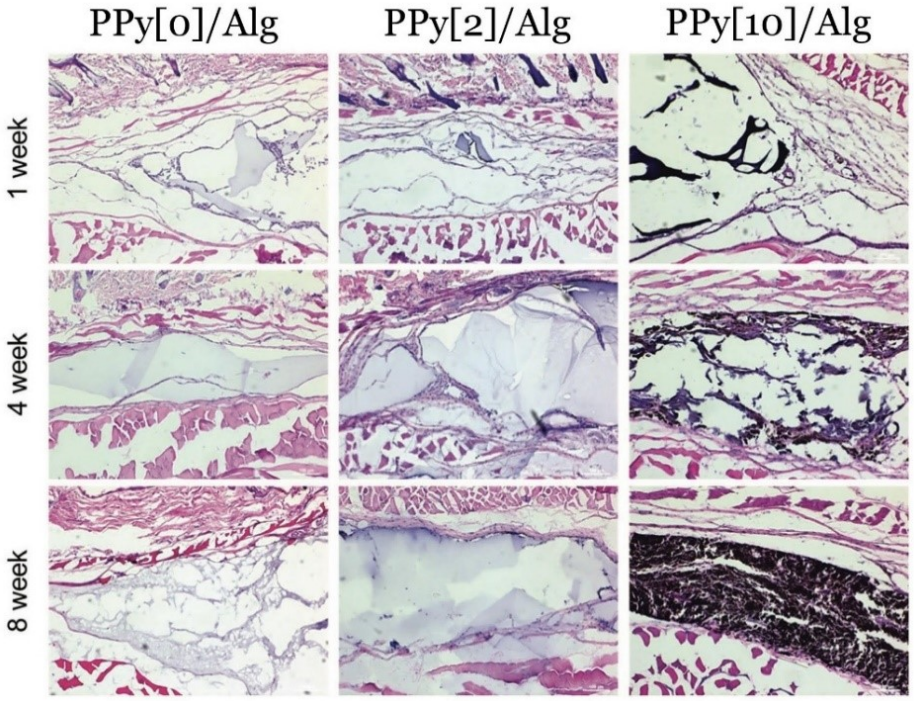


Figura 15: sezioni istologiche di impianto a livello sub-cutaneo colorate con ematossilina eosina dopo 1, 4 e 8 settimane su substrati con diverse concentrazioni di polipirrolo

È stato anche fatto uno studio istologico, di cui si riportano i risultati nella figura 15: si è proceduto ad un esperimento *in vivo* impiantando a livello sub-cutaneo, tra il derma e i muscoli, *PPy[10]/Alg hydrogel* con incapsulate le cellule staminali.

Come modello animale è stato utilizzato un topo *BALB/c* con sistema immunitario funzionante, in modo da poter constatare le eventuali reazioni avverse di infiammazione contro il *PPy[10]/Alg hydrogel* impiantato.

Dopo una settimana si è registrata una lieve risposta immunitaria da parte dei macrofagi contro l'alginato, ma con il proseguire delle settimane, la risposta infiammatoria è calata: questo andamento infiammatorio presente all'inizio ma che poi diminuisce è comune ad altri esperimenti *in vivo* in cui è stato inserito l'alginato.

Con il passare del tempo, alla settimana 4 e in modo particolare alla settimana 8, si è registrata una graduale degradazione dell'alginato, che ha permesso alle cellule incapsulate all'interno di infiltrarsi nei tessuti circostanti.

Fatto importante e degno di nota è che in nessuno degli esperimenti condotti, con le varie formulazioni di *PPy/Alg hydrogel*, è stata osservata una risposta infiammatoria acuta verso l'impianto, ma una lieve risposta immunitaria iniziale che con il passare del tempo è diminuita.

In conclusione, *PPy/Alg hydrogel* rappresenta un ottimo substrato per la crescita e il differenziamento neurale di cellule staminali. La presenza del polipirrolo ha migliorato fortemente le capacità della matrice di alginato dell'*hydrogel*, permettendo di incrementare l'adesione cellulare e la proliferazione. Inoltre applicando una tensione ai capi del substrato è possibile indirizzare il differenziamento delle cellule staminali verso il percorso neurale.

Tutto questo determina che *PPy/Alg hydrogel* abbia grandi potenzialità nell'ambito dell'Ingegneria Tessutale Neurale.

Applicazioni cliniche in Nanomedicina

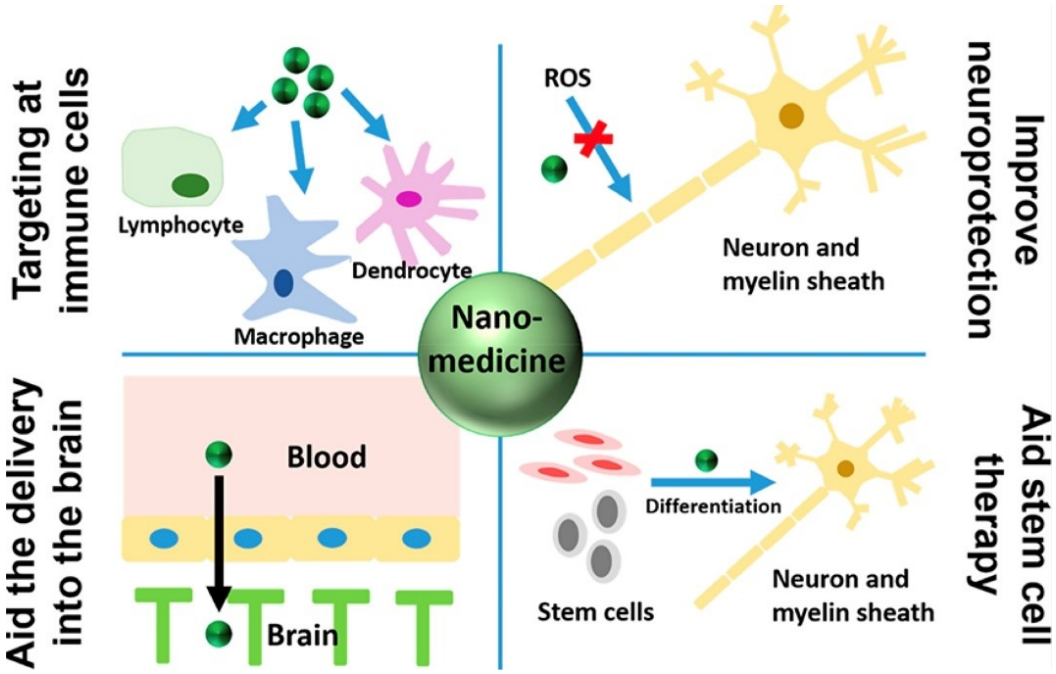


Figura 16: applicazioni e funzionamento degli approcci della Nanomedicina

In questo paragrafo si analizzano i recenti progressi in Nanomedicina (si veda figura 16) per la terapia della Sclerosi Multipla (in inglese *Multiple Sclerosis*, acronimo *MS*), grave patologia neurodegenerativa che è caratterizzata dalla perdita della guaina mielinica e che porta a disabilità motorie e sensoriali.

Un aspetto molto interessante e che sicuramente è bisognoso di maggiore ricerca è il fatto che vari studi su ampie popolazioni di pazienti affetti da *MS* hanno presentato un Manhattan Plot simile, da cui si evince che questa malattia neurodegenerativa ha anche una componente di predisposizione genetica.

Inoltre sono stati riportati anche dei fattori ambientali che potrebbero determinare un'interazione gene-ambiente oltre ai fattori genetici predisponenti.

Questa patologia è categorizzata come malattia autoimmune cronica demielinizzante (comprendente sia il sistema immunitario innato che quello adattativo). Si verificano infatti delle anomalie nel sistema immunitario che determinano l'attacco da parte dei linfociti T e delle cellule Natural Killer (NK) contro gli oligodendrociti e le cellule di Schwann, ovvero quelle cellule deputate alla formazione e al mantenimento della guaina mielinica.

Queste cellule del sistema immunitario che vanno ad attaccare gli oligodendrociti e le cellule di Schwann producono delle molecole di adesione, citochine e chemochine che permettono loro di attraversare l'endotelio dei vasi sanguigni e la barriera ematoencefalica (*BBB blood-brain barrier*).

Infine è stato osservato che la severità e la prognosi di *MS* è influenzata dalla presenza di cellule che presentano particolari antigeni come i linfociti T $CD4^+$ e $CD8^+$.

Come citato nel capitolo sulla biologia e fisiologia del sistema nervoso, l'importanza della presenza della guaina mielinica è fondamentale per la normale conduzione saltatoria del potenziale d'azione, e la progressiva degenerazione di questo strato isolante determina il rallentamento delle trasmissioni tra neuroni, con problemi che all'inizio si possono presentare lievi, ma che in stadi avanzati della malattia causano il decesso.

Gli attuali trattamenti per rallentare il processo di demielinizzazione sono fortemente ostacolati dalla presenza della *BBB* (si veda figura 17) costituita dagli astrociti, la quale blocca i farmaci e determina una bassa efficienza nella somministrazione di tali composti farmacologici nelle zone in cui ci sono presenti lesioni alla guaina mielinica.

Per superare questo ostacolo, in studi recenti hanno ricevuto notevole interesse gli interventi basati su nanoparticelle che hanno la possibilità di superare la *BBB* e quindi di fungere da sistema di *drug delivery* efficace nelle zone in cui è necessario.

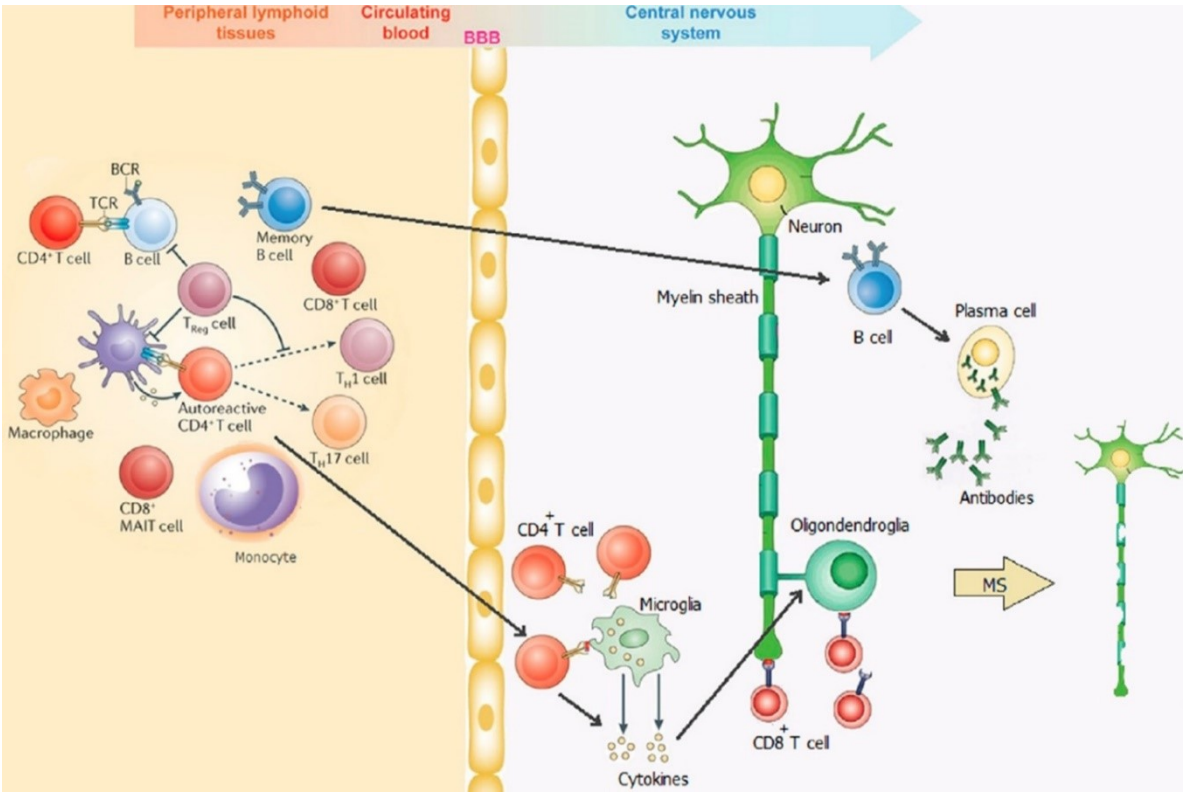


Figura 17: immagine che mostra l'anatomia della barriera ematoencefalica e la fisiopatologia di *MS* ovvero come, a partire da una risposta immunitaria anormale, possa avviarsi un processo infiammatorio neurodegenerativo che porta alla degradazione della guaina mielinica

Il progressivo avanzamento di *MS* è misurato dalla Scala di Stato di Disabilità di Kurtzke (E*DSS*): l'obiettivo perciò è di mantenere minimo questo valore per il maggior tempo possibile.
Per esempio, un paziente *EDSS* 4 ha limitate capacità deambulatorie ma non necessita di aiuti esterni come stampelle o bastoni, mentre un paziente *EDSS* 7 è costretto sulla sedia a rotelle.
Una delle caratteristiche più subdole e complesse di *MS* è la disseminazione spaziale, ovvero la possibilità che contemporaneamente possano realizzarsi lesioni in diverse regioni del SNC.
Per quanto riguarda gli attuali trattamenti per *MS* ci sono tre principali tipologie:

- trattamento per diminuire la frequenza delle esacerbazioni;
- terapie malattia-modificanti (*DMT*);
- terapie contro i sintomi.

La pratica più comune prevede la somministrazione di farmaci antinfiammatori per brevi periodi, come ad esempio un'alta dose di corticosteroidi. Un'altra possibilità consiste nel ricorrere alla plasmaferesi, ovvero la separazione del plasma dagli elementi corpuscolati del sangue.
I *DMT* rappresentano invece uno dei più importanti trattamenti per *MS*: lo scopo principale di questo approccio prevede l'attacco delle cellule immunitarie che si sono infiltrate nel SNC, come i linfociti T e B (si ricorda che fisiologicamente queste cellule non devono essere in grado di attraversare la *BBB* e di trovarsi a contatto con le cellule nervose).
Ulteriori possibilità per alleviare la sintomatologia dei pazienti in stadio avanzato prevedono l'utilizzo della neurochirurgia per il trattamento di dolori costanti al trigemino (V paia di nervi cranici) e per le disfunzioni legate al tratto urinario. Tuttavia questo approccio invasivo deve essere debitamente soppesato con gli eventuali rischi che un'operazione può comportare.
Di seguito si analizzano alcune categorie di nanoparticelle che presentano delle caratteristiche peculiari che determinano la possibilità di utilizzo per il trattamento di *MS*.

- Liposomi e Nanoparticelle lipidiche solide

  Si tratta di nanomateriali che presentano una componente lipidica con una membrana fosfolipidica e un cuore idrofilo: ciò permette a tali nanoparticelle di trasportare contemporaneamente attraverso la *BBB* sia farmaci idrosolubili (incapsulati al centro del nanomateriale) sia farmaci idrofobici legati alla porzione lipidica.

  Per aumentare la capacità di superare l'endotelio e di attraversare la *BBB* le nanoparticelle vengono funzionalizzate con gruppi carichi positivamente in quanto l'endotelio presenta una continuità di cariche negative esterne.

  Esempi concreti di questo tipo di nanomateriali che sono ancora utilizzati in fase di sperimentazione sono le nanoparticelle a base lipidica coniugate con l'albumina del siero

bovino (una proteina che si trova nel plasma del sangue bovino) oppure nanoliposomi funzionalizzati con peptidi trascrizionali trans-attivanti (*TAT*).

Studi di ricerca *in vitro* hanno portato alla conclusione che, se tali nanomedicine a base lipidica fossero utilizzate a livello clinico, porterebbero ad un migliore recupero e ad una maggiore efficacia nel bloccare l'avanzamento di *MS*, in quanto i liposomi permettono di rilasciare il farmaco proprio a livello delle lesioni del SNC, approccio molto più fruttuoso rispetto alla classica iniezione farmacologica endovenosa a livello sistemico.

Un recente studio ha proprio utilizzato nanoparticelle lipidiche solide come sistema di *drug delivery*, nello specifico per trasportare il dimetilfumarato, un farmaco da poco approvato dalla *FDA* per il trattamento di pazienti affetti da *MS* con episodi di ricaduta e peggioramento delle condizioni.

Nonostante si sia ancora nella fase di studi preclinici, si può affermare che queste nanoparticelle possono rappresentare un possibile futuro sistema per il trattamento efficace della Sclerosi Multipla.

- Nanoparticelle polimeriche

  Le nanoparticelle polimeriche sono da tempo conosciute per le loro proprietà di formare sistemi di *drug delivery*.

  Esempi di tali nanomateriali sono il copolimero di acido lattico e acido glicolico (*PLGA*), il policaprolattone (*PCL*), l'acido polilattico (*PLA*) e il polibutil-cianoacrilato (*PBCA*).

  Grazie alla loro biocompatibilità e biosicurezza, oltre che all'alto tasso di efficienza di *drug delivery*, la *FDA* ha approvato l'utilizzo di *PLGA*, *PLA* e *PCL* per utilizzi in ambito clinico.

  Queste nanoparticelle infatti possiedono la capacità di aumentare la penetrazione dei farmaci attraverso la *BBB*, ma è possibile funzionalizzarle con anticorpi, tensioattivi e transferrine per aumentare ulteriormente le loro proprietà.

  Come le nanoparticelle lipidiche solide, le nanoparticelle polimeriche hanno la capacità di trasportare farmaci sia idrofili che idrofobici, perciò sono ottime vescicole di trasporto per varie categorie di farmaci all'interno del SNC.

  Ad oggi queste nanoparticelle hanno subito un maggiore studio nella prospettiva di *drug delivery* per neoplasie come il glioblastoma oppure per malattie neurodegenerative quali il morbo di Parkinson e di Alzheimer, tuttavia hanno un potenziale molto elevato anche nel trattamento di *MS*, perciò sono necessari studi anche in questa direzione.

- Dendrimeri

  Si tratta di nanomateriali sempre utilizzati come *carrier* per i sistemi di *drug delivery* (si veda il paragrafo 1.1. relativo agli *hydrogel* utilizzati come *scaffold* per il trapianto di cellule staminali a livello intratecale per l'accesso al midollo spinale).

  Hanno una macrostruttura sferica e una nanostruttura ramificata, possono essere principalmente di natura proteica ma presentano all'esterno una superficie di molecole variabili che conferisce la proprietà di superare la *BBB*.

  I dendrimeri più promettenti per trattare *MS* sono i dendrimeri *ABP* (aminobis metilene fosfonato): sono stati già svolti esperimenti *in vivo* in cui sono stati somministrati dendrimeri caricati con un farmaco a dei topi affetti da encefalomielite autoimmune (patologia che rappresenta il modello animale di *MS*), con risultati positivi in quanto i dendrimeri, oltre a rilasciare il farmaco nei siti di interesse, hanno anche provocato l'alterazione della produzione di citochine rilasciate dalle cellule della milza, attivando un processo antinfiammatorio e diminuendo le cellule immunitarie. Infine i dendrimeri *ABP* hanno anche avuto un ruolo nel fermare l'attacco da parte dei linfociti T $CD4^+$ contro la mielina degli oligodendrociti: ciò è avvenuto tramite il blocco della produzione delle citochine da parte dei linfociti T, promuovendo invece la produzione di interleuchine.

  Ulteriori studi hanno dimostrato che i dendrimeri hanno la capacità di inibire condizioni infiammatorie generate dai leucociti neutrofili.

  In conclusione i dendrimeri hanno, non solo la capacità di fungere da vettore per farmaci, ma anche un'azione positiva antinfiammatoria: il prossimo step in questo settore è rappresentato dai *trial* clinici.

- Nanoparticelle di ossido di ferro superparamagnetiche (*SPION*)

  Sono nanoparticelle che rivestono un ruolo clinico per l'*imaging* e la diagnosi di molte malattie neurologiche, nello specifico hanno un grande potenziale per diagnosticare *MS*.

  Hanno anche funzione di *carrier* per i sistemi di *drug delivery* (si veda il paragrafo 1.1. relativo agli *hydrogel* utilizzati come *scaffold* per il trapianto di cellule staminali a livello intratecale per l'accesso al midollo spinale).

  Per ottimizzare gli *SPION* nell'ottica di fungere da vettori per il trasporto di farmaci, queste nanoparticelle possono subire un trattamento chimico per ottenere uno strato esterno stabilizzante formato da un polimero con gruppi Si-OH termicamente reticolabile, in modo da conferire agli *SPION* proprietà idrofile.

  Successivamente vengono incapsulati in una struttura come ad esempio un hydrogel di PEG o polietilenimmina.

Un'altra caratteristica propria degli *SPION* è quella di essere paramagnetici, perciò si potrebbe creare un sistema di guida magnetica tramite un forte gradiente magnetico esterno che indirizza le nanoparticelle nei siti di interesse (es. siti di lesione della guaina mielinica a causa di *MS*). Una volta che le nanoparticelle hanno raggiunto la regione di interesse, si può sfruttare un campo magnetico che genera ipertermia nella zona dove si trovano gli *SPION*, in modo da favorire il rilascio dei farmaci (si veda figura 18).

Questo approccio molto avanzato ha un duplice vantaggio, ovvero si può sia controllare e direzionare i movimenti delle nanoparticelle, e decidere successivamente quando queste debbano rilasciare il farmaco che stanno trasportando.

Ci sono però dei problemi di attuazione pratica in questo approccio, come ad esempio il modo in cui applicare il gradiente di campo magnetico dopo aver iniettato il supporto che contiene gli *SPION*; inoltre questa procedura è applicabile solo nei casi in cui è nota la precisa locazione di tutte le lesioni, cosa estremamente complicata da ottenere, in quanto non si conosce ancora come queste lesioni si sviluppino da un punto di vista topologico.

L'utilizzo degli *SPION* per il rilascio di farmaci tramite guida magnetica è dunque ancora agli albori, ciononostante ha grandi potenzialità una volta risolte le sfide tecnologiche.

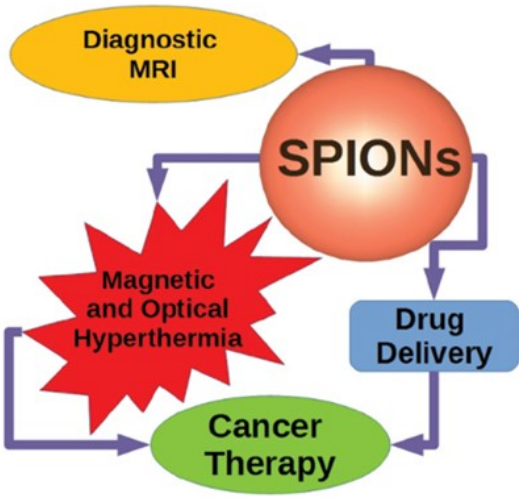


Figura 18: schema riassuntivo delle applicazioni degli *SPION*

La Nanomedicina rappresenta uno dei campi emergenti più promettenti per migliorare l'attraversamento da parte dei farmaci della *BBB*, attaccare le cellule immunitarie che degradano la mielina e fornire neuroprotezione alle cellule staminali eventualmente impiantate.

Infatti i nanomateriali hanno la capacità di portare i farmaci nei siti di lesione della guaina mielinica avendo la capacità di superare la barriera ematoencefalica.

Si riporta di seguito una tabella contente i farmaci approvati dalla *FDA* (*Food and Drug Administration*) per il trattamento di *MS*.

type of drug (brand name)	approval year	clinical administration method[a]	benefit[a]	common side effects
interferon β-1b (Betaseron)	1993	250 μg, SC, every other day	reducing the clinical exacerbations by 31%	injection site-related effect; flu-like symptoms; depression; leukopenia; hepatotoxicity
interferon β-1b (Extavia)	2009	250 μg, SC, every other day	reducing the clinical exacerbations by 34%	similar to above
interferon β-1a (Avonex)	1996	30 μg, IM, weekly	reducing exacerbations rate by 32%	similar to above
interferon β-1a (Rebif)	2002	22 or 44 μg, SC, three times a week	reducing exacerbations rate by 33%	similar to above
pegylated interferon β-1a (Plegridy)	2014	125 μg, SC, every 2 weeks	reducing exacerbations rate by 35.6%	similar to above
glatiramer acetate (Copaxone)	1997	20 mg, SC, once a day or 40 mg, SC, three times a week	reducing exacerbations rate by 29%	injection-site-related effect; dyspnea; palpitations; chest pain
glatiramer acetate (Glatopa)	2015	20 mg, SC, once a day	first genetic DMT drug; reducing exacerbations rate by 30%	similar to above
Natalizumab (Tysabri)	2004	300 mg, IV, every 28 days	significantly reducing clinical exacerbations; reducing long-term disability	headache; fatigue; PML; Infection; Infusion-related effect
Fingolimod (Gilenya)	2010	0.5 mg, PO, daily	significantly reducing clinical exacerbations; reducing long-term disability	bradycardia; edema in extremities; flu-like symptoms; back pain
Teriflunomide (Aubagio)	2012	7 mg or 14 mg, PO, daily	reducing exacerbations by 31%	headache; diarrhea; hair thinning; teratogenic risk; hepatotoxicity
dimethyl fumarate (Tecfidera)	2013	240 mg, PO, twice a day (120 mg twice a day for the first week)	significantly reducing clinical exacerbations	flushing; gastrointestinal reaction; leukopenia
Alemtuzumab (Lemtrada)	2014	12 mg, IV, daily for 5 days; 12 mg, IV, daily for 3 days after 1 year	reducing clinical exacerbations and long-term disability	thyroid gland disorders; secondary autoimmune disorders; infection
Daclizumab (Zinbryta)	2016	150 mg, SC, every28 days	reducing exacerbations by 45%	hepatotoxicity; noninfectious colitis; hypersensitivity reactions; depression; infection
Ocrelizumab (Ocrevus)	2017	300 mg, IV, over 2.5 h, and another 300 mg, 14 days later, followed by 600 mg over 3.5 h every 6 months	first PPMS treatment drug; reducing clinical exacerbations and long-term disability	back pain depression; infection; infusion-related effect; extremity pain
Siponimod (Mayzent)	2019	0.25 mg, PO, on days 1 and 2; 0.5 mg on day 3; 0.75 mg on day 4; 1.25 mg on day 5; 2 mg daily thereafter	reducing clinical relapses and long-term disability	headache; hepatotoxicity; bradycardia; immunity suppression; hypertension
Cladribine (Mavenclad)	2019	1.75 mg/kg, PO, daily for 4−5 days every month for 2 months; repeat at the second year	reducing clinical relapses and long-term disability	increased risk of malignancy; teratogenic risk; headache; infection

[a]SC, subcutaneous; IM, intramuscular; DMT, disease-modifying therapy; IV, intravenous; PML, progressive multifocal leukoencephalopathy; PO, per os (orally); PPMS, primary-progressive multiple sclerosis.

Bibliografia

1. Oliveira J., Carvalho L., Silva-Correia J., Vieira S., Majchrzak M., Lukomska B., Stanaszek L., Strymecka P., Malysz-Cymborska I., Golubczyk D., Kalkowski L., Reis R., Janowski M., Walczak P.
   Hydrogel-based scaffolds to support intrathecal stem cell transplantation as a gateway to the spinal cord: clinical needs, biomaterials, and imaging technologies
   Rivista: Nature Partner Journals, Australian Regenerative Medicine Institute
   2018, volume 3 (numero 8), pagina 6571–6597

2. Madhusudanan P., Raju G., Shankarappa S.
   Hydrogel systems and their role in neural tissue engineering
   Rivista: The Royal Society Publishing
   Centre for Nanosciences and Molecular Medicine, Amrita Institute of Medical Sciences and Research Centre, Kochi, India
   2020, volume 17 (numero 162), pagina 20190505

3. Yang S., Jang L., Kim S., Yang J., Kisuk Yang K., Cho S., Young Lee J.
   Polypyrrole/Alginate Hybrid Hydrogels: Electrically Conductive and Soft Biomaterials for Human Mesenchymal Stem Cell Culture and Potential Neural Tissue Engineering Applications
   Rivista: Macromolecular Bioscience Journals
   Gwangju Institute of Science and Engineering, Seoul, Republic of Korea
   2016, volume 16 (numero 11), pagine 1653-1661

4. Zeng Y., Li Z., Zhu H., Gu Z., Zhang H., Luo K.
   Recent Advances in Nanomedicines for Multiple Sclerosis Therapy
   Rivista: Applied Biomaterials, American Chemical Society
   2020, volume 3 (numero 10), pagine 6571-6597

Ringraziamenti

Alla mia forza di volontà e impegno

Ai miei genitori

A mia nonna

Alle mie compagne e compagni di università