



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**



**DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE
CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA**

**“BIOMATERIALI PER LA RIGENERAZIONE DEL TESSUTO
NERVOSO”**

Relatore: Prof. Andrea Bagno

Laureanda: Bianca Martina Agostinis

ANNO ACCADEMICO 2022 –2023

Data di laurea: 27 settembre 2023

Indice

Abstract	5
Introduzione: Il sistema nervoso	7
1.1 Struttura del Sistema Nervoso	7
1.1.1 Sistema Nervoso Centrale (SNC).....	7
1.1.2 Il Sistema Nervoso Periferico (PNS).....	8
1.1.3 Il Sistema Nervoso Autonomo (ANS).....	8
1.2 Istologia del sistema nervoso	8
1.2.1 I neuroni	9
1.2.2 La nevroglia.....	11
1.2.3 Struttura macroscopica del SNC	12
1.2.4 Struttura macroscopica del SNP.....	13
1.3 Danni al sistema nervoso.....	14
1.3.1 Lesioni al midollo spinale (SCI).....	14
1.3.2 Ictus	15
1.3.3 Le malattie neurodegenerative	15
1.3.4 Lesioni ai nervi periferici (PNI)	17
1.4 Rigenerazione del sistema nervoso centrale.....	18
1.4.1. La cicatrice gliale	18
1.4.2 Fattori inibitori	19
1.4.3 Terapie attuali.....	20
1.5 Rigenerazione dei nervi periferici	21
1.6 Ingegneria tessutale per la rigenerazione neurale.....	22
Capitolo 2: Biomateriali impiegati nella rigenerazione di tessuto neurale.....	25
2.1 Idrogel	25
2.2 Polimeri naturali.....	26
2.2.1 Collagene.....	26
2.2.2 Acido ialuronico	27
2.2.3 Cheratina	28
2.2.4 Alginato	28
2.2.5 Chitosano.....	29
2.3 Polimeri sintetici.....	29
2.3.1 Acido polilattico (PLA) e acido poliglicolico (PGA).....	30
2.3.2 Copolimero acido lattico – acido glicolico (PLGA).....	30
2.3.3 Glicole polietilenico (PEG)	31
2.3.4 Poli 2-idrossimetilmetacrilato (pHEMA).....	31

2.4 Polimeri elettricamente conduttivi	31
2.4.1 Polipirrolo (PPy).....	32
2.4.2 Polianilina (PANi).....	33
2.5 Nanomateriali a base di carbonio	33
2.6 Nanoparticelle	34
2.7 Nanofibre.....	35
2.8 Peptidi autoassemblanti.....	36
Capitolo 3: Fabbricazione degli Scaffold.....	37
3.1 Criteri di progettazione.....	37
3.1.1 Biocompatibilità e biodegradabilità	37
3.1.2 Proprietà meccaniche	38
3.1.3 Porosità.....	39
3.1.4 Guide topografiche	39
3.1.5 Struttura superficiale	40
3.2 Tecniche tradizionali di fabbricazione	40
3.2.1 Solvent casting/Particulate Leaching	40
3.2.2 Liquid phase separation.....	41
3.2.3 Self-Assembly	42
3.2.4 Gas Foaming.....	43
3.2.5 Freeze-drying.....	44
3.2.6 Hydrogel formation	44
3.2.7 Electrospinning.....	45
3.2.8 Electrospraying	46
Capitolo 4: Bioprinting.....	49
4.1 Bioprinting a getto d'inchiostro	50
4.2 Bioprinting basato sulla (micro)estrusione.....	52
4.3 Laser-assisted bioprinting.....	53
4.4 Stereolitografia (SLA).....	54
4.5 Bioplotting.....	56
Conclusioni.....	57
Bibliografia.....	59

Abstract

Il Sistema Nervoso è una componente chiave dell'organismo umano, per il quale svolge un ruolo fondamentale. Pertanto, danni o lesioni a tale sistema possono avere conseguenze devastanti, se non letali. Ripristinare il sistema nervoso danneggiato è una grande sfida dovuta alla complessità fisiologica, anatomica e funzionale, oltre che alla limitata capacità rigenerativa. Il presente elaborato cerca di dare una visione d'insieme sulle tecniche attuali per la rigenerazione e riparazione del tessuto nervoso, concentrandosi in particolare sul sistema nervoso periferico (PNS). Questa tesina parte da un'introduzione sul tessuto nervoso, con riferimento alle diverse tipologie di danni che esso può subire, per poi presentare una panoramica dei diversi tipi di biomateriali impiegati nella sua rigenerazione ed infine illustrare le tecniche di fabbricazione degli scaffold attualmente disponibili. Viene dato particolare rilievo alla trattazione del 3D bioprinting, il cui recente sviluppo e perfezionamento hanno aperto nuove possibilità nell'ambito dell'ingegneria tessutale, con risultati molto promettenti.

Introduzione: Il sistema nervoso

Il sistema nervoso è uno dei più elaborati e cruciali sistemi del corpo umano, con il compito di elaborare e coordinare le informazioni provenienti sia dall'ambiente esterno che dall'interno dell'organismo.

1.1 Struttura del Sistema Nervoso

Dal punto di vista anatomico il sistema nervoso si può suddividere in due componenti principali: il sistema nervoso centrale (SNC) e il sistema nervoso periferico (PNS). All'interno del PNS assume particolare importanza il sistema nervoso autonomo (ANS).

1.1.1 Sistema Nervoso Centrale (SNC)

Il sistema nervoso centrale svolge il fondamentale ruolo di comando e controllo dell'intero organismo: acquisisce, integra ed elabora gli stimoli afferenti provenienti dal PNS e invia in risposta dei segnali che prendono il nome di stimoli efferenti. Fornisce inoltre controllo a breve termine sull'attività degli altri sistemi ed apparati.

Esso è costituito da encefalo, midollo spinale, nervo ottico e retina e contiene la maggior parte dei corpi cellulari neuronali.

L'encefalo, che a sua volta si suddivide in cervello, cervelletto e midollo allungato, o tronco encefalico, è situato all'interno della scatola cranica, formata da placche ossee strettamente saldate fra loro. Esso controlla sia le attività volontarie che quelle involontarie e svolge complesse funzioni di integrazione [1].

Il midollo spinale è la porzione extracranica del SNC ed è contenuto e protetto dal canale vertebrale, una cavità cilindrica allungata formata da 33-34 vertebre sovrapposte all'interno della colonna vertebrale. Questa struttura presenta delle aperture tramite le quali si immettono i nervi cranici provenienti dal PNS. Esso trasporta informazioni da e per l'encefalo e svolge attività di integrazione di minor complessità.

Sia encefalo che midollo spinale sono quindi protetti da un rivestimento esterno di tessuto osseo, racchiuso da tre membrane sovrapposte, le meningi, con il compito di proteggere tali organi tramite la produzione di un fluido, il liquido cerebrospinale, che fa da cuscinetto protettivo in caso di urti. Partendo dall'interno esse prendono il nome di: pia madre, aracnoide e dura madre.

1.1.2 Il Sistema Nervoso Periferico (PNS)

Il PNS provvede invece alla connessione fra il SNC e gli altri sistemi ed apparati e con gli organi di senso. Si occupa della trasmissione dei segnali sensitivi e motori inviati da quest'ultimo per rispondere in maniera adeguata agli stimoli. Esso comprende tutto il tessuto nervoso al di fuori dell'SNC ed è costituito da strutture nervose periferiche specifiche che prendono il nome di nervi (suddivisi in nervi cranici e nervi spinali) e dalle loro ramificazioni. Fanno parte del PNS anche dei sensi speciali che percepiscono ed inviano all'encefalo stimoli sensitivi relativi a vista, udito, olfatto, gusto ed equilibrio e il sistema nervoso autonomo (ANS). I nervi spinali sono 31 paia, originano direttamente dal midollo spinale e fuoriescono in corrispondenza dello spazio fra ogni vertebra. La maggior parte di essi svolge sia funzioni sensoriali sia motorie.

I nervi cranici invece sono 12 paia, originano direttamente da una sola radice dall'encefalo e fuoriescono dal cranio attraverso fori nelle varie ossa che lo compongono. La maggior parte di essi svolge funzioni sensoriali, motorie o miste per la regione della testa e del collo [1].

1.1.3 Il Sistema Nervoso Autonomo (ANS)

Il sistema nervoso autonomo (ANS), detto anche della vita vegetativa, è costituito dai neuroni che innervano le ghiandole secretorie, la muscolatura cardiaca e quella liscia. Viene chiamato autonomo in quanto agisce in maniera praticamente indipendente dalla volontà. Esso è suddiviso in due sezioni: il sistema simpatico e quello parasimpatico.

Il sistema simpatico si occupa della risposta a situazioni di stress o intensa attività di organi quali cuore, polmoni, fegato o intestino: inibisce la salivazione, accelera il battito cardiaco, promuove la secrezione di adrenalina, blocca i riflessi sessuali e digestivi. Il sistema parasimpatico, invece, determina il normale funzionamento degli organi e degli apparati influenzando i muscoli viscerali e le ghiandole in modo opposto rispetto a quello parasimpatico; domina nelle situazioni di rilassamento [2].

1.2 Istologia del sistema nervoso

Il tessuto nervoso è costituito da due principali tipologie di cellule, i neuroni e la nevroglia, immersi nella matrice extracellulare cerebrale, che contiene anche vasi sanguigni e tessuto connettivo di sostegno. La sua struttura macroscopica è molto diversa nel SNC rispetto al PNS, riflettendo le diverse funzioni e strutture delle due componenti.

1.2.1 I neuroni

I neuroni rappresentano le unità funzionali e strutturali del sistema nervoso: essi sono dei centri di regolazione e integrazioni degli impulsi. Sono collegati fra loro a formare una rete neurale diffusa in tutto l'organismo, che permette al sistema nervoso di comunicare con le singole cellule del corpo e stabilire connessioni con tutte le componenti, sia interne che con l'ambiente esterno.

Le caratteristiche predominanti nelle cellule nervose sono una spiccata irritabilità, cioè la capacità di convertire gli stimoli esterni in impulsi nervosi, ed una elevata conducibilità, ovvero la capacità di trasmettere i segnali nervosi ad altre parti della stessa cellula o ad altre cellule.

Sebbene i neuroni presentino una notevole variabilità nelle dimensioni e nella forma, sono tutti caratterizzati da una struttura di base volta a favorire la trasmissione di segnali (Figura 1.1).

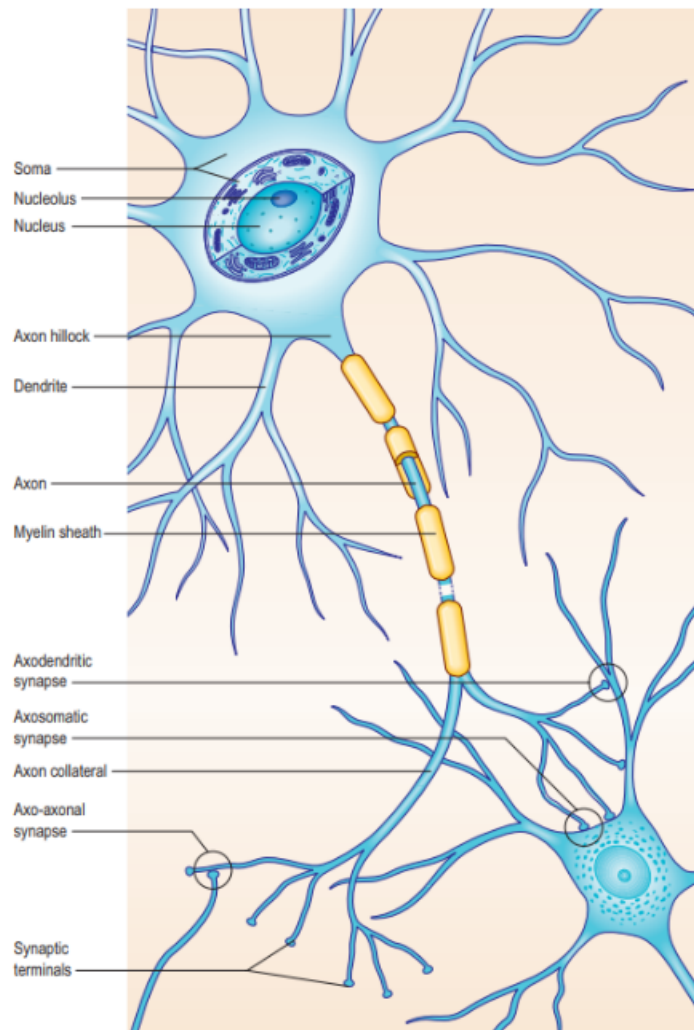


Figura 1.1: struttura di un neurone [3].

Tale struttura si distingue in un corpo cellulare arrotondato, soma o pirenoforo, che contiene il nucleo ed il citoplasma, e in prolungamenti ramificati che si dipartono da esso, responsabili dei contatti intercellulari. Tali prolungamenti a loro volta si dividono in dendriti e assone. L'assone è un unico lungo prolungamento che origina direttamente dal corpo cellulare e che si occupa della trasmissione delle informazioni in direzione centrifuga, mentre i dendriti sono prolungamenti di lunghezza e spessore inferiore, altamente ramificati che ricevono i segnali in ingresso e li trasmettono al corpo cellulare (conduzione centripeta) dove vengono convertiti in impulsi elettrici. I dendriti, dal punto di vista morfologico e funzionale, rappresentano espansioni del corpo cellulare finalizzate a massimizzare la superficie disponibile per i contatti intercellulari [2].

In base alla trasmissione dei segnali i neuroni sono suddivisi in:

- sensitivi o afferenti: raccolgono gli impulsi dai recettori periferici e li trasmettono all'SNC;
- motori o efferenti: trasmettono gli impulsi dal SNC agli effettori periferici;
- di connessione: trasmettono i segnali all'interno del SNC, contenuti interamente al suo interno.

I neuroni sono cellule post mitotiche e, tranne poche eccezioni, non vengono sostituiti quando vengono persi o danneggiati [3].

La comunicazione fra i neuroni, che formano la rete neurale, avviene attraverso la trasmissione di impulsi elettrici e chimici. Prendono il nome di sinapsi le zone deputate a questo compito. Esse sono strutture di interfaccia delimitate dalla membrana presinaptica del neurone trasmettitore e dalla membrana postsinaptica del neurone ricevente. Nel momento in cui arriva l'impulso, il terminale assonico del neurone presinaptico rilascia per esocitosi una certa quantità di neurotrasmettitore, generalmente una sostanza chimica, all'interno della fessura sinaptica. Tale sostanza viene assorbita dai recettori che si trovano sui dendriti del neurone postsinaptico, determinando un cambiamento nella conduttanza della sua membrana e inducendo in esso una depolarizzazione o un'iperpolarizzazione che si propaga lungo l'assone.

Un singolo assone può effettuare collegamenti sinaptici con un solo neurone o, cosa che capita più spesso, con molti neuroni. Gruppi di sinapsi fra due o più neuroni formano unità interattive incapsulate dalla nevroglia [3].

Un ruolo importante nella trasmissione neurale è svolto dalla mielina, una sostanza di natura lipidica che riveste e avvolge l'assone per gran parte della sua lunghezza. La presenza di strati multipli concentrici di mielina isola il prolungamento assonale ed evita la dispersione del segnale elettrico, impedendo ai potenziali elettrici di degradarsi lungo il loro cammino

nell'assone. Se inizialmente si pensava che la mielina servisse solo da isolante, è ormai assodato che svolga anche un ruolo attivo di sostegno metabolico ai neuroni, regolando l'omeostasi e adattandosi ai segnali neuronali dipendenti dall'attività [4].

Una volta trasmesso il segnale, lo spazio sinaptico viene liberato e preparato a ricevere l'impulso successivo, dando vita al complesso schema della mappa neurale che comprende circa 100 miliardi di neuroni, ognuno dei quali può sviluppare sino a 10mila connessioni sinaptiche [1].

1.2.2 La neuroglia

L'altra componente fondamentale del sistema nervoso è rappresentata dalla neuroglia, o glia: il termine deriva dal greco 'glia' e significa colla. Essa è composta dalle cellule gliali, particolari cellule nervose di supporto che si dispongono a circondare il soma dei neuroni e avvolgono l'assone, formando una guaina continua. Le cellule gliali variano notevolmente per tipo, numero e funzione nelle diverse regioni del Sistema Nervoso e sono presenti in un rapporto di 10-50:1 rispetto ai neuroni, dipendentemente dalla zona considerata.

La neuroglia del SNC si può suddividere in due gruppi principali in base all'origine, le macroglia o ectoglia (astrociti, oligodendrociti e cellule ependimali) e le microglia, o mesoglia (Figura 1.2).

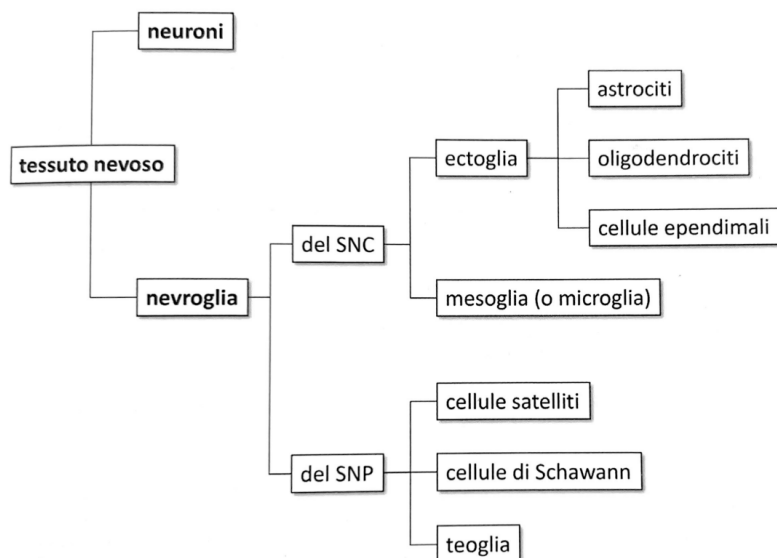


Figura 1.2: classificazione delle cellule del tessuto nervoso [2].

Le microglia sono le cellule immunitarie del cervello: sono cellule altamente ramificate presenti in tutte le aree del SNC in uguale densità, la cui funzione è simile a quella dei macrofagi. La

variazione della loro morfologia è indice dell'attivarsi di una risposta ad un processo patologico nel cervello [3].

Le macroglia nascono all'interno della placca neurale, parallelamente ai neuroni, costituiscono la grande maggioranza delle cellule gliali e assumono diverse funzioni:

- astrociti: sono il tipo di cellula gliale più abbondante e diversificato, dalla morfologia estremamente varia. Generalmente si tratta di piccole cellule dotate di numerose propaggini che circondano le aree sinaptiche e partecipano al rilascio, trasporto e ricezione dei neurotrasmettitori [2];
- oligodendrociti: la loro funzione è quella di produrre la guaina mielinica degli assoni del SNC. Un singolo oligodendrocita può produrre la guaina mielinica di fino a 50 segmenti assonali [3];
- cellule ependimali: hanno caratteristiche epiteliali, secernono e distribuiscono il liquido cerebrospinale, fondamentale per la protezione del SNC, un foglio continuo che riveste i ventricoli, plessi coroidei e il canale centrale della SC.

Nel PNS le cellule gliali sono invece principalmente classificate come:

- cellule di Schwann (SC): svolgono una funzione analoga a quella degli oligodendrociti, avvolgendo gli assoni periferici e secernendo mielina attorno ad essi. Le cellule di Schwann hanno un ruolo centrale nella risposta a lesioni acute del PNS;
- cellule satellite: formano delle strutture attorno al soma dei neuroni a cui forniscono supporto strutturale, garantiscono l'isolamento elettrico e la perfusione delle sostanze nutrienti.

1.2.3 Struttura macroscopica del SNC

A livello macroscopico i tessuti che compongono il SNC sono composti da due sostanze diverse, la sostanza grigia e la sostanza bianca. Esse si distinguono sia per la composizione cellulare che per le funzioni che svolgono.

Nel SNC i corpi cellulari delle cellule nervose tendono ad aggregarsi separatamente dai loro assoni, occupando così aree diverse. La materia grigia è costituita dall'insieme dei dendriti, dei corpi cellulari e dei terminali assonici, tutte parti prive di mielina. Alcuni di questi corpi cellulari possono essere organizzati in strati o nuclei, ovvero raggruppamenti di cellule che svolgono funzioni simili all'interno del SNC. Le zone costituite da sostanza grigia rappresentano i centri di integrazione e elaborazione dell'informazione. Essa forma la parte

periferica, o corteccia, degli emisferi cerebrali e del cervelletto e la regione centrale del midollo spinale.

La materia bianca è costituita principalmente da assoni ricoperti da guaina mielinica che si dipanano dalla sostanza grigia e contiene pochi corpi cellulari. Tali assoni sono organizzati in fasci attraverso i quali si propaga il segnale elettrico e che collegano le diverse zone del SNC: i fasci ascendenti portano principalmente informazioni sensoriali verso i nuclei (vie afferenti) mentre i fasci discendenti portano principalmente informazioni efferenti verso organi e tessuti (vie efferenti). La sostanza bianca occupa la parte centrale degli emisferi cerebrali e del cervelletto e la porzione periferica del midollo spinale [1,2].

1.2.4 Struttura macroscopica del SNP

Nel PNS e nel ANS, i corpi cellulari tendono a riunirsi formando i gangli mentre l'assone è circondato, oltre che dalla guaina di cellule di nevroglia, anche da un sottile rivestimento di tessuto connettivo lasso. L'assone così rivestito forma la fibra nervosa. Più fibre nervose poste parallelamente e associate con fasci di tessuto connettivo vanno poi a costituire il nervo, la struttura tipica del SNP (Figura 1.3). I nervi sono circondati da guaine di tessuto connettivo che ricoprono l'intero nervo chiamate epinervio. Il perinervio avvolge invece le singole fibre nervose e da esso si dipana l'endonervio che riempie gli spazi fra di esse. L'endonervio contiene anche una sottile rete di capillari per il rifornimento di ossigeno e nutrienti, facilmente danneggiabile da traumi [14].

Dal punto di vista funzionale il SNP è diviso in:

- vie afferenti: inviano informazioni sotto forma di impulsi sensoriali al SNC per mezzo di fibre sensitive che costituiscono la radice dorsale o posteriore;
- vie efferenti: ricevono gli impulsi motori dal SNC e li inviano alle cellule bersaglio per mezzo delle fibre motorie che costituiscono la radice ventrale o anteriore.

Le radici dorsale e ventrale si uniscono formando poi il tronco del nervo spinale appena uscite dal canale vertebrale e per questo motivo i nervi spinali sono detti anche nervi misti di senso e di moto. I gangli spinali sono localizzati nello spessore di queste due radici.

I nervi cranici hanno invece una sola radice posta in determinate zone dell'encefalo. I gangli dei nervi cranici sono situati nel tratto iniziale dei nervi cranici di senso e misti [2].

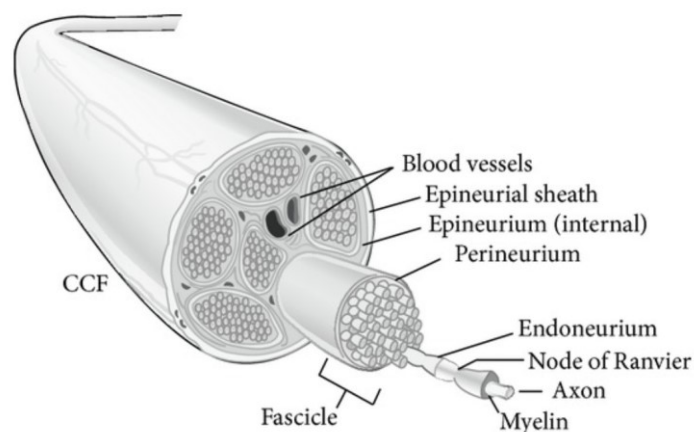


Figura 1.3: struttura di un nervo periferico [14].

1.3 Danni al sistema nervoso

Le lesioni al sistema nervoso umano impattano su oltre 1 miliardo di persone in tutto il mondo, con 6,8 milioni di decessi annuali, e sono correlate ad un'ampia varietà di disturbi, tra cui malattie neurodegenerative, lesioni traumatiche del cervello e del midollo spinale (SC), ictus e lesioni ai nervi periferici [16]. La loro origine può essere di diverso tipo, tra cui forme traumatiche come cadute, incidenti stradali o aggressioni sebbene in alcuni casi rimanga ancora ignota.

1.3.1 Lesioni al midollo spinale (SCI)

La lesione al midollo spinale (Spinal Cord Injury, SCI) è una condizione neurologica devastante che porta alla perdita delle funzioni sensoriali, motorie e del sistema nervoso autonomo. Essa si verifica a seguito di un evento traumatico come può essere un incidente automobilistico (38%), una caduta (32%), un atto di violenza (14%) o un infortunio sportivo (8%), che causa traumi improvvisi alla colonna vertebrale e provoca fratture e lussazione delle vertebre [6,7].

Il trauma causa una complessa serie di eventi molecolari e cellulari: infatti la normale fisiologia del midollo spinale comporta interazioni tra molti tipi di cellule come astrociti, neuroni, microglia e oligodendrociti e a seguito di una lesione spinale, queste interazioni multicellulari vengono interrotte e disorganizzate, causando un danno cellulare locale [6]. Tale lesione viene seguita da una cascata di eventi secondari non meno dannosi quali ischemia, infiammazione, edema, morte cellulare, degenerazione assonale, gliosi e formazione di tessuto cicatriziale che comportano cambiamenti biochimici, meccanici e fisiologici all'interno dei tessuti neurali nei dintorni della zona danneggiata. Questi cambiamenti possono aggravare la lesione primaria e

innescare lesioni secondarie che causano ulteriori problemi come disfunzione di organi interni, infezioni, dolore cronico e problemi cardiaci e respiratori [6,7].

Al giorno d'oggi non esiste una cura permanente per le SCI, ma l'obiettivo è duplice: prevenire la cascata di eventi associati alla lesione secondaria e rigenerare il tessuto spinale danneggiato, con il conseguente ripristino delle sue funzioni. Non è ancora stato trovato un farmaco efficace dalla funzione neuroprotettiva, mentre l'ingegneria tissutale per i tessuti neurali sembra avere grandi potenzialità. È quindi in corso la ricerca di un approccio combinato che utilizzi strategie neuroprotettive e neuro-rigenerative per indirizzare simultaneamente i due obiettivi, via che sembra essere la più promettente [6].

1.3.2 Ictus

Un ictus, noto anche come colpo apoplettico o attacco cerebrovascolare, è un'interruzione del flusso sanguigno al cervello o al midollo spinale che causa la morte cellulare dei neuroni ivi compresi in un arco di tempo compreso tra i 20 minuti e i 10 giorni dopo l'evento. Questo può accadere per due ragioni. L'ictus ischemico (87%) si verifica quando un coagulo o una placca aterosclerotica blocca una delle arterie che forniscono il sangue al cervello, causando una carenza di ossigeno e nutrienti nella zona interessata e una conseguente cascata di eventi neurotossici che portano alla morte neuronale. Invece l'ictus emorragico si verifica quando un vaso sanguigno si rompe, causando una fuoriuscita di sangue nel cervello e danneggiando i tessuti circostanti.

L'ictus è la seconda causa di morte e la principale causa di disabilità in Europa: ogni anno circa 1,1 milione di persone sono colpite da ictus. Nonostante siano stati compiuti significativi passi avanti nella prevenzione e nel trattamento acuto dell'ictus nel corso degli ultimi anni, esso rimane una malattia dalle conseguenze devastanti: tra il 20% e il 35% dei pazienti muore durante il primo mese dopo l'ictus e circa un terzo dei sopravvissuti perde le proprie capacità cognitive presentando deficit come emiparesi, incapacità di camminare e/o parlare, confusione e stato mentale alterato. L'ingegneria tissutale si pone come una promettente possibilità di ricostruzione dei tessuti danneggiati anche per recuperare questo tipo di deficit neurologici [12,13].

1.3.3 Le malattie neurodegenerative

Le malattie neurodegenerative (ND) come l'Alzheimer, il morbo di Parkinson o la sclerosi multipla sono un'ampia classe di disturbi caratterizzati da una progressiva perdita della popolazione neurale in specifiche regioni del cervello, provocando danni permanenti.

Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità, le ND sono la settima causa di morte in tutto il mondo e la seconda nei paesi altamente sviluppati e la loro frequenza sta continuando a crescere. Si stima che entro il 2050 oltre 152 milioni di persone soffriranno di demenza, di cui il 60-80% solo della malattia di Alzheimer [5].

Esistono diversi tipi di ND, che interessano aree cerebrali diverse con sintomi distinti, ma tutte condividono alcune caratteristiche come disfunzione vascolare precoce, aggregazione e diffusione di proteine misfolded, vulnerabilità selettiva di particolari neuroni e attivazione delle risposte immunitarie. In particolare, il processo di misfolding delle proteine, sia nei neuroni che nelle cellule gliali, e la loro riaggregazione errata è comune a tutte le ND e comporta la disfunzione cellulare, la perdita di sinapsi e infine danni cerebrali.

Un altro aspetto comune a questo tipo di malattie è che le cellule microgliali passano da avere funzioni neuroprotettive ad un ruolo deleterio.

Tra le ND, la malattia di Alzheimer (AD) è la più comune, con circa 46,8 milioni di casi in tutto il mondo e si prevede che questo numero raddoppierà ogni 5 anni. Essa è una malattia neurodegenerativa lentamente progressiva e irreversibile, correlata alla perdita neuronale nella regione dell'ippocampo. I sintomi prevedono demenza, disturbi della memoria e della consapevolezza spaziale, disfunzione del movimento, depressione, delirio e allucinazioni. In molti casi comporta anche afasia anomica, acalculia e apatia.

L'onere dell'AD colpisce gli individui, le loro famiglie e l'economia, con costi globali stimati di 1 trilione di dollari all'anno. Al momento, non esiste una cura, solo due tipi di trattamenti farmacologici in grado di migliorarne la sintomatologia [8].

Il morbo di Parkinson (PD) è il secondo disturbo neurodegenerativo più comune, si manifesta principalmente nei pazienti anziani ed è dovuta alla degenerazione dei neuroni dopaminergici nella sostanza grigia del mesencefalo e alla comparsa di ammassi proteici chiamati corpi di Lewy nei nuclei del tronco encefalico e della corteccia cerebrale. La conseguenza è la deprivazione della dopamina, il neurotrasmettitore deputato al controllo dei movimenti. I pazienti affetti da PD mostrano tremore a riposo, rigidità, bradicinesia e postura curva e i sintomi, che sono sia motori che non, poi degenerano in disturbi neurocomportamentali, deterioramento cognitivo (demenza) e disfunzione autonoma. Anche per il morbo di Parkinson manca ancora una terapia definitiva in grado di arrestare la malattia [9].

La sclerosi multipla (SM) è una malattia autoimmune neurodegenerativa che deriva dalla demielinizzazione degli assoni della sostanza bianca del SNC: conseguentemente essi perdono la capacità di scambiarsi gli impulsi elettrici. Il danno tissutale della SM interessa solo il CNS, risparmiando quello periferico. La diagnosi di questa malattia è ancora molto difficile e viene

effettuata tramite la correlazione di evidenze di danni infiammatori del SNC, che si esplicano in spasticità, tremore e debolezza, con risultati anomali di test di risonanza magnetica e analisi del liquido cerebrospinale (CSF). La sclerosi multipla è la principale causa di disabilità neurologica non traumatica nei giovani adulti, ancora senza cura [10,11].

La Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA) è una ND comune, con un tasso di sopravvivenza di 2-5 anni dopo l'esordio che avviene mediamente intorno ai 65 anni di età. Colpisce in maniera concomitante sia i motoneuroni superiori che quelli inferiori nella corteccia, nel tronco cerebrale e nel midollo spinale. I sintomi sono debolezza, atrofia muscolare e spasticità. Attualmente sono stati approvati solo due farmaci ma entrambi hanno un effetto lieve sui sintomi della SLA [7].

1.3.4 Lesioni ai nervi periferici (PNI)

La principale causa di danni al sistema nervoso periferico è rappresentata dalle lesioni dei nervi periferici (Peripheral Nerve Injury, PNI), molto invalidanti per il paziente a causa della privazione delle capacità motorie e sensoriali. Le PNI sono piuttosto comuni in quanto i nervi, a differenza del SNC, racchiuso da ossa e meningi, sono scarsamente protetti e si trovano in una posizione superficiale in tutto il corpo umano. La maggior parte di esse si verifica nell'arto superiore ed è dovuta a cause traumatiche, le più comuni sono incidenti automobilistici, traumi conseguenti ad atti di violenza, cadute e incidenti sul lavoro [21].

Queste lesioni spesso portano alla de-nervazione di organi importanti, con un impatto devastante sulla qualità della vita del paziente. A seconda della lesione, è possibile una vasta gamma di sintomi ed esiti, dipendenti dalla gravità e dal tipo di trauma, dall'età e dal tipo di nervi coinvolti. I sintomi tipici sono difetti sensoriali e della funzione motoria, che arrivano a causare la completa paralisi dell'arto interessato o lo sviluppo di dolore neuropatico intrattabile, con possibilità di recupero molto basse.

Purtroppo, al giorno d'oggi non esiste ancora una soluzione ottimale per affrontare questo problema: a differenza di altri tessuti del corpo, la rigenerazione dei nervi periferici è lenta e di solito incompleta. Molte volte è necessario un intervento chirurgico per la riparazione del nervo danneggiato, ma da una metanalisi pubblicata nel 2005 [22] è emerso che solo il 51,6% delle riparazioni del nervo mediano e ulnare raggiunge un recupero motorio soddisfacente e solo il 42,6% sperimenta anche un recupero sensoriale soddisfacente.

L'obiettivo primario della riparazione nervosa è quello di consentire la re-innervazione degli organi bersaglio guidando la rigenerazione degli assoni sensoriali, motori e autonomici

nell'ambiente del nervo distale con la minima presenza possibile di fibre nervose sulla linea di sutura.

Non esiste ancora un test diagnostico non invasivo in grado di diagnosticare in modo preciso la presenza o la gravità di una lesione nervosa nelle prime sei settimane dopo l'infortunio; pertanto, attualmente la diagnosi si basa ancora su esami clinici e/o su esplorazioni chirurgiche [14,15].

1.4 Rigenerazione del sistema nervoso centrale

Una qualsiasi lesione del tessuto nervoso, indipendentemente dalla causa, induce ischemia tessutale e quindi danneggia le componenti cellulari. Nel SNC, in seguito ad una lesione, gli assoni subiscono un distacco dal loro corpo cellulare e vanno incontro ad un rapido deterioramento. Nel momento in cui avviene il distacco, la parte distale dell'assone sigilla la membrana per ristabilire l'equilibrio fra ambiente interno ed esterno al neurone mentre l'assone va incontro a degenerazione walleriana.

Se il neurone non riceve una quantità sufficiente di neurotrasmettitore è destinato a morire: quindi, il recupero strutturale e funzionale della cellula nervosa dipende dalla sua capacità di rigenerare l'assone. Queste capacità sono molto limitate in età adulta, sia a causa di fattori intrinseci, ovvero la scarsa capacità del neurone di rigenerare, dovuta al fatto che non esprimono una serie di fattori necessari per entrare nello stato di crescita attiva, sia da fattori intrinseci, cioè legati all'ambiente in cui vivono. È assodata infatti la natura patogena dell'ambiente extracellulare del SNC: sono stati identificati diversi inibitori attivi della rigenerazione degli assoni. È importante notare che queste due classi di fattori non sono indipendenti l'una dall'altra.

1.4.1. La cicatrice gliale

Le cellule danneggiate dalla lesione rilasciano ATP che agisce sui recettori purinergici delle cellule gliali, innescandone gli stati attivi. In particolare, vengono attivati gli astrociti che iniziano a proliferare molto rapidamente (vengono quasi duplicati), cambiano il loro fenotipo e popolano densamente l'area intorno alla lesione per formare un bordo di cicatrice astrocitaria, che prende il nome di cicatrice gliale, dal ruolo protettivo ed inibitorio.

La cicatrice gliale forma una barriera chimico/fisica che blocca la rigenerazione degli assoni. Infatti, gli astrociti interagiscono con le altre cellule gliali causando la produzione permanente di diverse molecole inibitorie.

Gli stessi astrociti reattivi, in particolare il sottogruppo A1, svolgono un potente ruolo neurotossico o neuroprotettivo, in grado di uccidere oligodendrociti o altre cellule gliali. Essi, infatti, rilasciano un eccessivo numero di fattori che inibiscono la neo-genesi e la corretta mielinizzazione del neurone, causando un'inflammatione cronica.

Le microglia sono il primo tipo di cellula reattiva nelle reazioni a cascata dopo le lesioni e sono responsabili della risposta infiammatoria e autoimmune alla lesione, della fagocitosi per la rimozione dei detriti e dell'induzione del fenotipo neurotossico degli astrociti. Gli astrociti sono anche responsabili del reclutamento dei macrofagi che, tramite fagocitosi, rimuovono i detriti tossici dai tessuti danneggiati, ma eliminano anche i neutrofili morenti mediante efferocitosi. La loro eccessiva attività contribuisce anche a reazioni a cascata dannose e danni secondari e può promuovere la morte neurale [18].

1.4.2 Fattori inibitori

L'ostilità dell'ambiente cellulare del SNC è riconducibile a diverse classi di molecole: si tratta sia di componenti della matrice extracellulare presente nella cicatrice gliale che si forma in seguito alla lesione, sia di molecole associate alla mielina che circonda gli assoni.

La mielina degli oligodendrociti del SNC inibisce la rigenerazione assonale attraverso un recettore Nogo-66 della proteina di membrana neuronale (NgR1). Infatti, almeno tre distinte proteine espresse dagli oligodendrociti, tra cui la glicoproteina associata alla mielina (MAG), la glicoproteina oligodendrocita-mielina (OMgp) e Nogo, sono capaci di legarsi alla stessa proteina di membrana legata al GPI NgR1.

Alcune molecole della famiglia delle efrine e delle semaforine sono già presenti nel tessuto nervoso in condizioni normali, in quanto durante lo sviluppo fungono da segnali repulsivi di guida assonica ma la loro produzione viene sovra-regolata in seguito alla lesione. Questo concorre alla limitazione dell'allungamento assonale nel SNC danneggiato.

I polidendrociti, antigeni neurone-gliale² (NG2), presenti esclusivamente nella membrana cellulare nel SNC, stabiliscono sinapsi con l'assone reciso, contribuendo così al suo mancato sviluppo.

I proteoglicani altamente solfatati, CSPG, sono una famiglia di grandi molecole della matrice extracellulare cerebrale, altamente caricate negativamente, formati da una proteina core da cui si dipana un numero variabile di catene laterali di GAG. Essi sono concentrati nelle reti perineuronali e possono attaccarsi alla membrana neuronale. In seguito alla lesione del SNC vengono rapidamente sovra-regolati dagli astrociti reattivi nei tessuti cicatriziali gliali, con livelli più elevati nell'epicentro di tali tessuti. I CSPG inibiscono la crescita degli assoni

ostacolando il legame con la laminina e altre molecole della matrice adesiva ai loro recettori transmembrana. Infine, si legano ad almeno due diverse categorie di recettori inibitori della crescita espressi sulle superfici assonali, attivando specifici percorsi inibitori. Pertanto, assumono un ruolo nella limitazione della riparazione neurale sopprimendo l'estensione degli assoni attraverso il sito della lesione e inibendo la germinazione collaterale da assoni risparmiati vicino ad essa [18, 19].

1.4.3 Terapie attuali

Nonostante vi siano molti studi sulle possibili terapie per i danni al tessuto nervoso centrale, i trattamenti attualmente disponibili si limitano ad affrontare per lo più i sintomi derivanti dalle varie patologie, non i meccanismi alla base di esse. Principalmente si occupano di prevenire la lesione secondaria attraverso la somministrazione di steroidi e di un adeguato apporto di ossigeno e flusso sanguigno per riparare ai danni. Nei casi più gravi può essere necessario anche un intervento chirurgico per rimuovere gli ematomi e riparare le contusioni.

Molti problemi sorgono nel trattamento delle lesioni del SNC, in primis la permeabilità della barriera ematoencefalica (BBB) che impedisce ai farmaci somministrati di raggiungere livelli terapeutici efficaci nel cervello. Per questo motivo, è necessario sviluppare una strategia bioattiva e biomimetica in grado di attraversarla. Una tecnica promettente è rappresentata dalla terapia genica che, alterando o inducendo l'espressione di geni specifici utilizzando vettori virali modificati derivati principalmente da virus adeno-associati, può svolgere un ruolo importante nella neuroprotezione, nel recupero e correzione dei meccanismi patogenetici delle lesioni al tessuto nervoso.

Inoltre, negli ultimi anni molti studi si sono concentrati sullo sviluppo di agenti chimici in grado di inibire ed eliminare il misfolding delle proteine, aspetto comune di molti disturbi neurodegenerativi, in modo da rimuovere e prevenire il loro effetto citotossico.

Un nuovo approccio terapeutico emerso recentemente riguarda l'utilizzo di cellule staminali: esse hanno l'illimitata capacità di rinnovarsi e sono in grado di differenziarsi in molti tipi di cellule. Le cellule staminali mesenchimali (MSC) sono state individuate come le più adatte in ragione della loro elevata disponibilità, quantità soddisfacenti e immunogenicità molto bassa. Se coltivate in determinate condizioni sembrano in grado anche di differenziarsi in neuroni e cellule gliali, ma la complessità del microambiente del tessuto nervoso comporta molte limitazioni a questo tipo di approccio clinico. Il problema più grande è dato dalla scarsa correlazione fra il loro comportamento in vitro e quello in vivo, in quanto il microambiente è fondamentale per la loro differenziazione.

In questa prospettiva, gli scaffold di biomateriali proposti dall'ingegneria tissutale appaiono come strumenti estremamente promettenti per lo sviluppo di sistemi di coltura 3D innovativi e per applicazioni in vivo, con l'obiettivo di ottimizzare l'effetto delle cellule staminali nel trattamento delle lesioni cerebrali. La capacità degli scaffold bioingegnerizzati di emulare l'ambiente della matrice extracellulare (ECM) favorirebbe una migliore infiltrazione cellulare, promuovendo quindi la proliferazione e la differenziazione cellulare. Infine, la capacità di modulare il comportamento delle cellule attraverso la funzionalizzazione suggerisce che tali supporti rappresentino un'opzione ideale, da integrare con le cellule, nel campo della rigenerazione neurale [7].

1.5 Rigenerazione dei nervi periferici

A causa di PNI, alcuni assoni di un nervo periferico vengono recisi e degradano in un processo chiamato degradazione walleriana: i monconi distali al sito della lesione sperimentano variazioni cellulari, gli assoni collassano, le SC scartano la loro mielina e vengono reclutati i macrofagi che iniziano a fagocitare gli assoni degenerati e i detriti mielinici. Le cellule di Schwann però sopravvivono e, dopo pochi giorni, a causa della mancata connessione con gli assoni, iniziano una vigorosa proliferazione differenziandosi in un fenotipo pro-rigenerativo che rilascia fattori di crescita specifici, promuovendo la rigenerazione degli assoni e la sopravvivenza dei neuroni dopo l'assotomia. Le SC si allineano insieme e vanno a formare le bande di Bugner, fibre altamente allineate, che hanno un ruolo chiave nella guida dell'assone e dei suoi coni di crescita, dal sito prossimale a quello distale. Anche gli stessi neuroni si concentrano sulla rigenerazione assonale avviando la sintesi proteica. Per questo i nervi periferici riescono a rigenerarsi spontaneamente se la lesione è sufficientemente piccola; in questi casi è sufficiente suturare insieme le estremità del fascio assonale ferito.

Invece, per lesioni più grandi, generalmente di larghezza superiore ai 10 mm, il ripristino autonomo è molto più difficile a causa dell'insufficiente innervazione assonale dei bersagli distali. In questi casi, il gold standard clinico è l'autoinnesto, ovvero l'utilizzo di tessuto raccolto in un altro sito, meno importante, dello stesso paziente. Anche questo approccio presenta però delle problematiche come la limitata disponibilità di innesti nervosi, il fatto che comporti il sacrificio del nervo donatore e le risposte immunologiche che non sempre sono positive. Infatti, nel sito di riparazione inevitabilmente si registrano cicatrici e fibrosi da punti sutura, lesioni e disallineamenti dei fascicoli che possono rallentare la rigenerazione.

Un approccio molto simile è quello dell'allograft, ovvero l'innesto di nervi cadaverici di origine umana o animale; questo trattamento permette una fornitura illimitata ed evita la

morbilità del sito donatore ma, d'altra parte, è meno efficace in quanto richiede trattamenti di immunosoppressione o decellularizzazione per evitare il rigetto immunitario [14].

Pertanto, l'ingegneria tissutale per la rigenerazione del tessuto nervoso periferico per il momento si concentra nel facilitare la rigenerazione e la guida del nervo e poi nel prevenire la formazione di tessuto fibroso che impedisce al nervo di esercitare le sue capacità rigenerative [16].

1.6 Ingegneria tissutale per la rigenerazione neurale

Negli ultimi anni ci si sta indirizzando verso un approccio basato sulla medicina rigenerativa e sull'ingegneria tissutale, oggetto di numerose ricerche scientifiche.

L'ingegneria tissutale viene definita come "un campo interdisciplinare che applica i principi dell'ingegneria e delle scienze della vita verso lo sviluppo di sostituti biologici che ripristinano, mantengono o migliorano la funzione dei tessuti". In particolare, combina principi e tecniche di biologia cellulare, scienza dei materiali e ingegneria biomedica per fabbricare sostituti tissutali che imitano la natura strutturale e fisiologica del tessuto nativo, con l'obiettivo fondamentale di ristabilire, rigenerare o sostituire le proprietà funzionali di un tessuto o un organo danneggiato o malato. Queste strategie aprono le porte a nuove possibilità terapeutiche, in particolare per i pazienti più giovani e per gli atleti, consentendo il loro reinserimento e il ripristino delle funzioni biologiche [14].

In termini pratici, l'ingegneria tissutale consiste nello sfruttare varie tecniche come il trasferimento cellulare, le nanotecnologie e la bioingegneria per fabbricare strutture artificiali, generalmente chiamate scaffold. Gli scaffold presentano caratteristiche morfologiche tali da emulare la matrice extracellulare (ECM) per poter ospitare e sostenere le colture cellulari e favorirne la crescita fino alla rigenerazione del tessuto danneggiato. Il loro obiettivo è quello di ricreare un ambiente che agevoli adesione, migrazione e proliferazione delle cellule, ne guidi il comportamento e veicoli il trasporto di nutrienti.

Il tessuto nervoso è senza dubbio il più complesso sistema dell'anatomia umana e per questo ha sempre rappresentato una sfida cruciale nel campo dell'ingegneria tissutale. Richiede infatti scaffold caratterizzati da architetture complesse. Come conseguenza dell'intensa attività di ricerca in questo campo, sono stati sviluppati una varietà di approcci sintetici e metodi di fabbricazione 3D per la produzione di scaffold (Figura 1.4) [16].

I polimeri, sia di origine sintetica che naturale, hanno mostrato risultati positivi per l'ingegnerizzazione del tessuto neurale, tra cui la crescita dei neuriti e la differenziazione delle

cellule staminali neurali umane. Nuove strategie volte al trattamento delle lesioni del SNC e del PNS includono scaffold polimerici, idrogel, nanoparticelle e condotti nervosi [21].

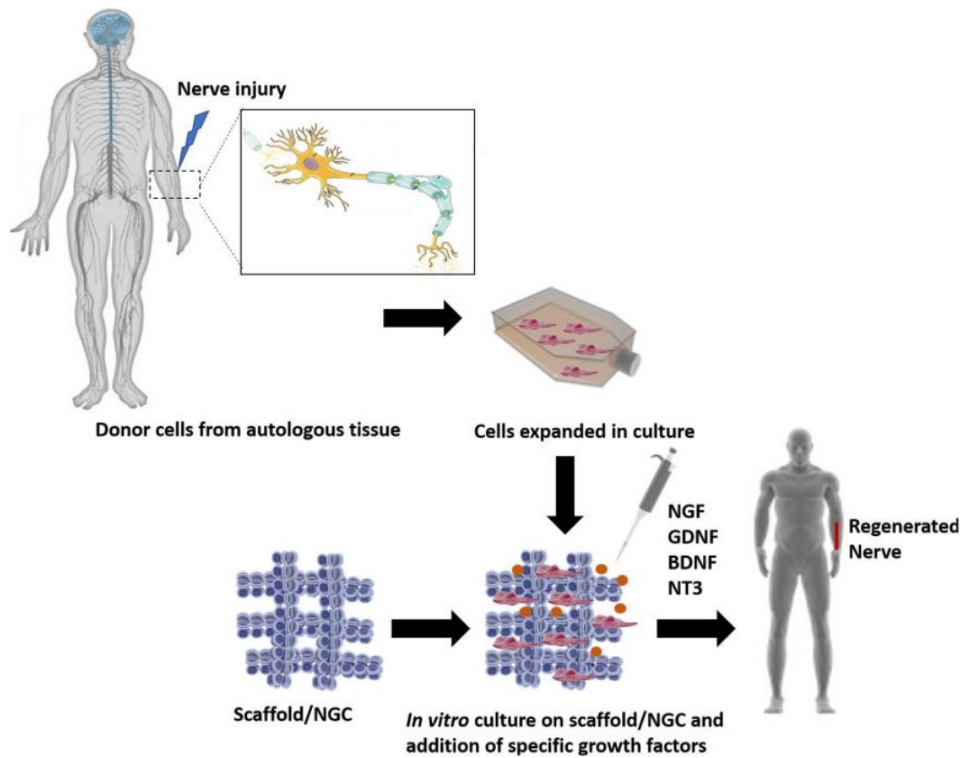


Figura 1.4: modello di applicazione delle tecniche di ingegneria tissutale. Cellule, scaffold e fattori biochimici contribuiscono a realizzare un costrutto ingegnerizzato che sia analogo al tessuto nervoso autologo.

Capitolo 2: Biomateriali impiegati nella rigenerazione di tessuto neurale

Si definisce biomateriale un "qualsiasi materiale, ad eccezione dei farmaci, che interagisce con i tessuti viventi e svolge una particolare funzione senza causare effetti avversi" [7]. In questo capitolo si riporta un'analisi dei principali biomateriali implicati nella rigenerazione tessutale nervosa.

2.1 Idrogel

Nel delicato campo della rigenerazione del tessuto nervoso i biomateriali più utilizzati sono i polimeri, a causa della loro elevata biocompatibilità. Molto spesso i polimeri, di origine sia naturale sia sintetica, in questo ambito vengono usati sotto forma di idrogel.

Gli idrogel sono reti polimeriche tridimensionali, altamente idratate e insolubili in acqua, tenute insieme da reticoli chimici e/o fisici. L'alto contenuto di acqua, la porosità e la consistenza morbida degli idrogel, consentono loro di trasportare ossigeno, sostanze nutritive e fattori solubili per simulare la matrice extracellulare di alcuni tessuti biologici meglio di altri biomateriali (Figura 2.1).

Nei gel fisici la rete polimerica è tenuta insieme da entanglement molecolari o forze secondarie e pertanto sono reversibili quando si modificano le condizioni ambientali come la temperatura o il pH. Nei gel chimici, la rete è ottenuta reticolando i polimeri; la reticolazione avviene tramite polimerizzazione tridimensionale, in cui un monomero idrofilico viene polimerizzato da un agente reticolante e quindi purificato, oppure polimerizzazione diretta, che non necessita di purificazione.

Gli idrogel vengono utilizzati per la somministrazione di farmaci e cellule nello studio e nel trattamento delle malattie neurodegenerative, dove le cellule vengono incapsulate in strutture tridimensionali di idrogel da impiantare nel tessuto cerebrale. Alternativamente, l'idrogel stesso può essere impiantato in uno stato pregel, al fine di formare il gel direttamente nel tessuto nervoso lesionato, permettendo una localizzazione più precisa delle cellule impiantate. Le strutture 3D consentono la crescita delle cellule in un ambiente permissivo, in cui sono favoriti sia l'ingresso di ossigeno e sostanze nutritive che l'uscita di prodotti di scarto. Inoltre, la struttura tridimensionale può fungere da barriera per le cellule infiammatorie o fattori avversi nel tessuto ospite [7].

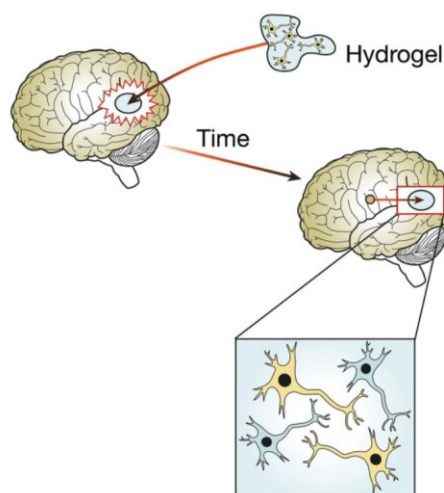


Figura 2.1: un idrogel polimerico seminato con cellule neurali viene impiantato chirurgicamente in una lesione tessutale causata da un ictus. Con il tempo, i neuroni superstiti iniziano a comunicare con le cellule seminate nell'idrogel, riformando le connessioni neurali e ripristinando le funzioni originali del tessuto cerebrale.

2.2 Polimeri naturali

L'uso di polimeri naturali è altamente vantaggioso grazie all'elevata biocompatibilità e cinetica di biodegradazione naturale, che si combinano con proprietà chimicamente regolabili. Spesso i polimeri naturali sono analoghi, se non identici, a sostanze già presenti nel corpo umano e questo riduce al minimo i rischi di citotossicità e reazione immunogenica al momento dell'impianto nell'organismo. Per questo sono i polimeri più ricercati nell'ingegneria del tessuto neurale e sono stati studiati pre-clinicamente a lungo in numerosi modelli animali, compresi i primati. Per contro spesso i polimeri naturali presentano deboli caratteristiche meccaniche, sensibilità termica, difficoltà di lavorazione e richiedono l'uso di solventi; questi fattori ostacolano la loro efficacia come biomateriali e possono comportare il rischio di antigenicità e trasmissione di malattie, spingendo i ricercatori a combinarli con polimeri sintetici o elettroconduttivi [21,50].

2.2.1 Collagene

Il collagene è una proteina strutturale che rappresenta circa il 25% della componente proteica dell'intero organismo umano. È costituito da catene catene polipeptidiche (α -chains), formate da oltre 1400 aminoacidi, intrecciate fra loro in modo da formare una superelica compatta [2]. Esistono 28 tipi diversi di collagene, di cui il più importante e comune è il tipo I, che fornisce struttura e supporto in tutto il corpo umano.

Il collagene è un materiale altamente biocompatibile, biodegradabile e non citotossico, che permette quindi di supportare la crescita cellulare. Morfologia e anisotropia delle fibre di collagene possono essere manipolate attraverso trattamenti chimici e fisici come la modica del

pH o della temperatura, mentre l'aggiunta di altri componenti naturali o sintetici può modularne le proprietà meccaniche [20].

Gran parte del collagene impiegato nell'ambito dell'ingegneria tessutale deriva da risorse di natura umana o animale, con particolare attenzione rivolta alla specie bovina. Il trapianto fra specie, tuttavia, può suscitare una risposta immunogenica. Inoltre, il comportamento meccanico del collagene in vivo può essere variabile e in alcuni individui è stata riscontrata la possibilità di reazioni allergiche ad alcuni tipi di collagene.

Il collagene è l'unico biopolimero attualmente approvato per studi clinici finalizzati alla rigenerazione dei nervi periferici. Infatti, esso è un possibile riempitivo interno per condotti neurali, aumentando la qualità della rigenerazione dei nervi periferici anche su intervalli piuttosto lunghi. I condotti nervosi a base di collagene sono quelli più biocompatibili attualmente disponibili in ambito clinico e la loro efficacia è spesso paragonabile al gold standard clinico, l'innesto di nervi autologhi [23,24].

Un'altra interessante applicazione di questo biomateriale è rappresentata dal collagene di tipo I allineato magneticamente come riempitivo per tubi di collagene. Questo metodo ha significativamente impattato sulla rigenerazione nervosa in lesioni di 6 mm sui topi e ha guidato l'allungamento dei neuriti e l'invasione delle cellule di Schwann [25].

Il collagene può essere anche usato in combinazione con altri biopolimeri o proteine. Ad esempio, un'impalcatura di collagene ordinata lineare reticolata con laminina, una proteina chiave della ECM nel sistema nervoso, ha guidato la crescita assonale e migliorato la rigenerazione nervosa e il recupero funzionale nei ratti [26].

2.2.2 *Acido ialuronico*

L'acido ialuronico (HA) è un glicosamminoglicano presente nella matrice extracellulare dei tessuti connettivi in varie parti del corpo umano, dove svolge un ruolo cruciale nella lubrificazione. L'HA è stato studiato a lungo per scopi di ingegneria tessutale grazie alle sue proprietà regolabili, tra cui biodegradabilità, biocompatibilità, biorisorbibilità e capacità di formazione di idrogel.

Gli idrogel di HA supportano la crescita, la differenziazione e la proliferazione dei precursori neurali. In particolare, le proprietà meccaniche di tali idrogel sembrano capaci di influenzare tale differenziazione, aprendo nuove possibilità per le terapie delle malattie neurodegenerative. Inoltre, la sua elevata biocompatibilità è sfruttata per ridurre la risposta infiammatoria generata dai polimeri elettro-conduttivi nell'ingegneria del tessuto neurale [27].

2.2.3 Cheratina

La cheratina è una proteina dalla struttura ad elica, le cui struttura quaternaria si basa sulla formazione di ponti di disolfuro tra gli amminoacidi di cisteina e legami inter- e intra-molecolari di acidi polari e non polari che formano le sue catene. I legami disolfuro conferiscono alla cheratina una struttura tridimensionale compatta e forniscono un'elevata resistenza alle reazioni chimiche o enzimatiche. Grazie alle sue ottimali caratteristiche di biodegradabilità, biocompatibilità e non immunogenicità, la cheratina mostra una grande capacità di creare substrati e bio-scaffold adatti alla rigenerazione del tessuto nervoso. Inoltre, la sua struttura terziaria e quaternaria può essere facilmente modificata per adattarsi a un particolare tessuto [28].

In particolare, l'attività biologica della cheratina facilita la proliferazione e l'infiltrazione delle cellule di Schwann, cosa che l'ha resa uno dei primi biomateriali studiati ed implicati nel trattamento delle lesioni dei nervi periferici. Diversi studi [55,56] hanno dimostrato come gli idrogel di cheratina migliorino la riparazione dei condotti producendo risultati elettrici e istologici a lungo termine equivalenti all'autoinnesto del nervo stesso, promuovendo la rapida rigenerazione dei nervi periferici *in vivo*.

Un recente studio [29] ha sfruttato un idrogel di cheratina in combinazione con guide nervose in PCL per colmare una lesione del nervo sciatico di 15 mm in un modello di ratto, promuovendo la migrazione delle cellule di Schwann e degli assoni. In un altro studio [30] sono stati usati scaffold di idrogel di cheratina per colmare un notevole divario di 2 cm in un modello di coniglio e, sebbene i condotti di cheratina non abbiano avuto lo stesso successo degli autoinnesti nervosi, hanno indotto un miglioramento significativo nel recupero complessivo.

La cheratina può essere facilmente elettrofilata in combinazione con altri polimeri non naturali con caratteristiche meccaniche superiori, migliorando la loro biocompatibilità con risultati eccellenti: ad esempio, uno scaffold nanofibroso di cheratina combinata con alcool polivinilico (PVA) [31] ha permesso l'adesione, la proliferazione e la vitalità delle cellule gliali *in vitro*, confermando le grandi potenzialità di questo biomateriale.

2.2.4 Alginato

L'alginato è un biopolimero anionico naturale solitamente ottenuto da alghe brune. Ha trovato un crescente interesse nell'ingegneria tessutale, oltre che per la biocompatibilità, soprattutto per il basso costo e per le caratteristiche di gelificazione.

Tuttavia, a causa della sua origine, esso presenta diverse impurità come metalli pesanti, endotossine, proteine e composti polifenolici. Pertanto, l'alginato deve essere sottoposto ad una

procedura di estrazione in più fasi per essere purificato in modo da ridurre al minimo le possibili risposte immunogeniche o infiammatorie al momento dell'impianto [32].

L'alginato viene utilizzato per diverse applicazioni biomediche, come la somministrazione di farmaci e proteine, la guarigione delle ferite e come substrato per la coltura cellulare. La sua applicazione principale nell'ingegneria del tessuto neurale riguarda il trattamento della lesione del midollo spinale nei ratti, dove mostra un continuo successo nel rigenerare piccole lacune nervose che vanno da 2 a 4 mm di ampiezza [33]. Inoltre, scaffold ibridi di alginato combinato con altri biopolimeri, sia naturali che sintetici, hanno recentemente mostrato un grande potenziale per la rigenerazione dei nervi periferici.

2.2.5 Chitosano

Il chitosano è un polisaccaride lineare ottenuto dalla deacetilazione chimica della chitina, il principale polisaccaride strutturale dei crostacei e molluschi. È un biomateriale estremamente biocompatibile, non citotossico, biodegradabile e presenta attività antibatterica e antitumorale. È particolarmente versatile in quanto può essere facilmente trasformato in spugne, gel, membrane, perline e matrici per adattarsi a un'applicazione specifica. Inoltre, il chitosano può essere modificato chimicamente con facilità, grazie alla capacità di adsorbire molecole adesive, come collagene, fibronectina, laminina e genipina. Queste molecole reagiscono con le proteine sulla superficie delle cellule di Schwann e supportano la loro adesione e proliferazione, mostrando grande potenziale nel dirigere la rigenerazione dei nervi periferici [34].

Il chitosano ha anche la capacità di formare idrogel che risultano particolarmente promettenti nell'ambito dell'ingegneria tessutale grazie alle loro capacità di promuovere adesione e sopravvivenza cellulare, oltre che la crescita di neuriti. Inoltre, scaffold di chitosano combinati con NGF hanno mostrato un effetto sinergico nella differenziazione delle cellule staminali e hanno mostrato il potenziale per rigenerare sia il PNS che il SNC [35].

La nanotecnologia sfrutta il chitosano come per fornire farmaci antitumorali e fattori di crescita al SNC. Infine, il chitosano ha trovato una recente applicazione nel 3D-bioprinting come biomateriale di supporto nella stampa a scrittura diretta di cellule staminali neurali umane [57].

2.3 Polimeri sintetici

I polimeri sintetici sono vantaggiosi a causa della loro resistenza meccanica e flessibilità combinate ad una facilità di modifica e personalizzazione. Infatti, le loro proprietà strutturali possono essere modificate in molti modi, tra cui la miscelazione e la copolimerizzazione e risultano compatibili con numerose tecniche di fabbricazione degli scaffold. Questi polimeri

sono non tossici ma sussistono problemi legati ai loro prodotti di degradazione o monomeri residui dovuti alla loro polimerizzazione incompleta, che invece possono rivelarsi tali. Per questo i polimeri sintetici richiedono test intensivi e completi prima della applicazione in ambito clinico.

2.3.1 Acido polilattico (PLA) e acido poliglicolico (PGA)

L'acido polilattico (PLA) è un poliesteri biodegradabile derivato dall'acido lattico, un composto naturale normalmente presente nell'organismo e quindi ben tollerato e facilmente metabolizzato. Grazie alla sua biocompatibilità e biodegradabilità è stato utilizzato con successo per progettare e costruire scaffold che forniscono supporto alle cellule di Schwann, consentendo l'allungamento degli assoni. Tuttavia, gli scaffold in PLA sono risultati dimensionalmente o strutturalmente instabili, spesso frantumati e accartocciati [36].

L'acido poliglicolico (PGA) deriva invece dall'acido glicolico, anch'esso facente parte del nostro organismo. Analogamente al PLA, i nano-condotti a base di PGA hanno eccellenti proprietà meccaniche che ne favoriscono l'uso in contesti clinici, ma è stato dimostrato che perdono progressivamente la loro resistenza dopo 1-2 mesi dall'impianto. A causa della loro natura instabile, sono limitati a colmare piccoli divari nervosi [37].

2.3.2 Copolimero acido lattico – acido glicolico (PLGA)

A causa dell'instabilità delle strutture in PLA o PGA, molto spesso viene preferito il loro copolimero, l'acido poli lattico-co-glicolico (PLGA) che restituisce strutture dalle proprietà meccaniche superiori.

Inoltre, modificando il rapporto di PLA: PGA è possibile controllare le caratteristiche del copolimero, tra cui permeabilità, rigonfiamento, deformazione e tasso di degradazione, per adattarsi ad applicazioni specifiche, in particolare microparticelle per la somministrazione di farmaci e condotti per la rigenerazione nervosa.

Viene utilizzato per creare scaffold multicanale seminati con cellule di Schwann, che hanno dimostrato avere effetti sinergici sulla rigenerazione neurale, nonostante siano necessari ulteriori studi per promuovere il recupero funzionale [38]. Inoltre, il PLGA risulta molto efficace nel trasporto di agenti terapeutici attraverso la BBB, per fornire farmaci antitumorali e fattori neutrofici per il trattamento delle malattie neurodegenerative a zone specifiche del cervello [39].

2.3.3 Glicole polietilenico (PEG)

Il poli(etilenglicole) (PEG) è un polimero sintetico biodegradabile di unità di ossido di etilene (EO). Il PEG è altamente biocompatibile e adatto per l'uso negli idrogel grazie alle sue proprietà idrofiliche, cruciali per il trasporto di nutrienti e rifiuti, ed è anche biochimicamente inerte. Inoltre, il PEG non è immunogenico ed è resistente all'assorbimento proteico. A causa della sua bioinerzia, a differenza dei polimeri naturali utilizzati negli idrogel, viene spesso usato sotto forma di piccole particelle in combinazione con altri polimeri [40].

Il PEG viene usato principalmente sotto forma di idrogel, ampiamente sfruttati per l'ingegneria del tessuto neurale: la crescita delle cellule neuronali su idrogel di PEG migliora la sopravvivenza, la proliferazione e la differenziazione delle cellule neurali, mostrando un grande potenziale per il trattamento delle lesioni del SNC [41].

Inoltre, il PEG ha mostrato risultati promettenti dopo la lesione del midollo spinale, accelerando e migliorando significativamente il processo di ri-sigillatura della membrana e ripristinando l'integrità meccanica dopo la compressione.

2.3.4 Poli 2-idrossimetilmetacrilato (pHEMA)

Il poli(2- idrossietil metacrilato) (pHEMA) è un polimero che forma idrogel in acqua per la sua natura estremamente idrofila, è biocompatibile. Esso può polimerizzare a basse temperature, (tra -20°C e +10°C) e questo permette di immobilizzare le proteine in idrogel e di incorporare composti bioattivi nello scaffold polimerico. Gli idrogel pHEMA, previa modifica della formulazione e della chimica superficiale, vengono realizzati su misura per adattarsi a un'applicazione specifica, sia nel SNC che nel PNS, imitando l'ambiente del tessuto ospite. Possono essere applicati come condotti di guida nervosa, inibitori endovenosi della morte cellulare e come strutture 3D che supportano la formazione del tessuto nervoso.

2.4 Polimeri elettricamente conduttivi

Come già visto, i neuroni comunicano fra loro e con altri tipi di cellule tramite una complicata rete di impulsi elettrici. Idealmente, quindi, gli scaffold neurali dovrebbero saper replicare le proprietà elettriche del tessuto nervoso autologo in modo da migliorare la proliferazione e la migrazione delle cellule neuronali. Pertanto, in questo settore, i polimeri elettricamente conduttivi rivestono un ruolo di particolare importanza. Il loro nome deriva dal fatto che hanno la debole capacità di trattenere elettroni nella loro struttura e questo permette di trasferire

intrinsecamente segnali elettrici alle cellule senza l'uso di dispositivi esterni per la stimolazione elettrica.

Per poter manipolare le proprietà dei materiali conduttivi, essi devono subire un processo di drogaggio, o 'doping', mediato dall'aggiunta di molecole droganti. In particolare, l'estrazione di elettroni dalla banda di valenza (p-doping) genera "buchi carichi positivi" nella struttura elettronica, mentre l'aggiunta di elettroni alla banda di conduzione (n-doping) genera una carica negativa. In entrambi i casi viene creata una possibile mobilità di carica degli elettroni, quindi la conduttività migliora.

Il drogaggio serve a migliorare non solo le prestazioni elettriche, ma anche la proprietà meccaniche del materiale, che, quando non modificato, è insolubile e difficilmente lavorabile a causa della sua rigida struttura coniugata.

I polimeri così trattati mostrano buona stabilità, conduttività elettrica e capacità di incapsulare e rilasciare molecole. Inoltre, le loro proprietà elettriche, chimiche e fisiche possono essere modificate per adattarsi a un'applicazione specifica.

Lo svantaggio è la loro incapacità di degradazione; pertanto, comportano la necessità di interventi chirurgici o trattamenti che possono essere particolarmente invasivi. Per ovviare a questo problema, i polimeri conduttivi vengono sistematicamente miscelati con altri polimeri biodegradabili, sia sintetici che naturali in origine, combinando proprietà elettroconduttive cruciali con biomateriali biologicamente più favorevoli [58].

2.4.1 Polipirrolo (PPy)

Il polipirrolo (PPy) è un polimero organico formato dalla polimerizzazione del monomero pirrolico ed è uno dei polimeri conduttivi più comunemente usati nell'ingegneria del tessuto neurale. Esso viene utilizzato principalmente in combinazione con altri polimeri sintetici biodegradabili come PLA, PLGA e PCL, o naturali, come l'acido ialuronico, per migliorarne la biocompatibilità.

Attualmente il Polipirrolo è usato come materiale elettrodico per dispositivi neuroprotesici impiantabili a lungo termine. Uno studio [43] ha infatti dimostrato come la conduttività del PPy sullo strato superficiale di questi dispositivi permetta di creare un'interfaccia neurale elettrostimolante e biologicamente attiva, che limita le reazioni immunitarie avverse e favorisce l'interazione diretta con il tessuto.

Inoltre, PPy viene utilizzato anche come sistema controllato elettricamente per la somministrazione localizzata di farmaci al SNC.

2.4.2 Polianilina (PANi)

La polianilina (PANi) è un altro utile polimero conduttivo dalle molteplici ed interessanti proprietà, tra cui alta conduttività, facile sintesi, basso costo e facile disponibilità. Analogamente al polipirrolo, deve essere usata in combinazione con altri polimeri biodegradabili per mitigare la sua scarsa capacità di degradazione.

Gli idrogel PANi sono stati sviluppati per la rigenerazione dei nervi periferici e come substrati per il differenziamento delle cellule staminali neurali [44]. Inoltre, PANi ha recentemente mostrato risultati promettenti, se polimerizzata su film prefabbricati di chitosano, nella realizzazione di un cerotto elettroconduttivo, o ‘bioelectronic patch’, che funge da supporto sintetico per la realizzazione degli scaffold. Questa tecnologia può efficacemente accoppiarsi con i tessuti elettroreattivi per modularne la fisiologia e permetterne la stimolazione terapeutica (Figura 2.2) [45].

Questo materiale può essere adattato a dispositivi di diverso tipo, aprendo una nuova gamma di possibili tendenze per il suo impiego nell'ingegneria del tessuto neurale.

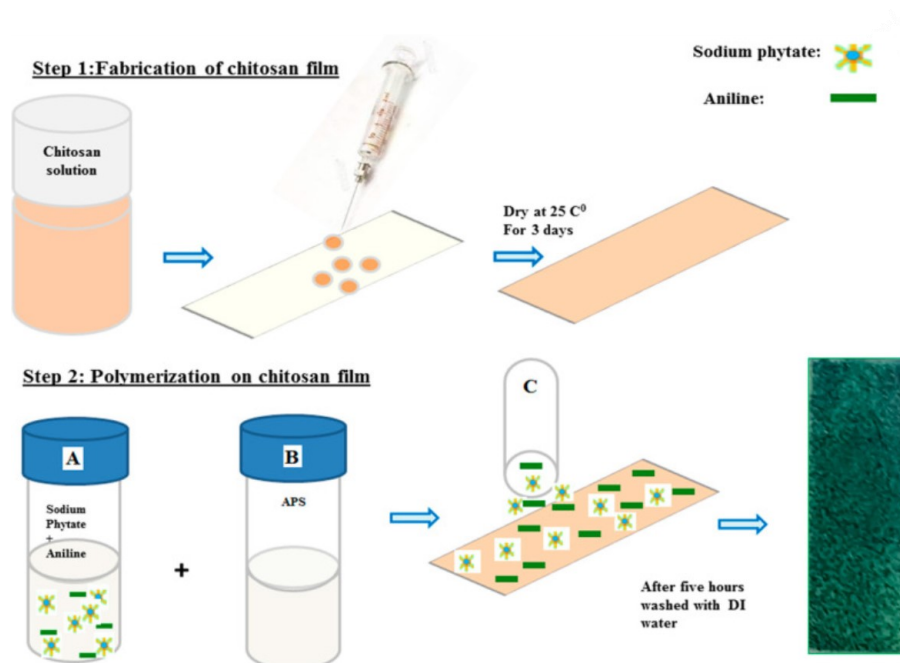


Figura 2.2: sintesi di un cerotto polianilina-chitosano

2.5 Nanomateriali a base di carbonio

Oltre ai biomateriali polimerici, l'ingegneria del tessuto neurale utilizza anche nanomateriali a base di carbonio in virtù delle loro proprietà intrinseche di conduttività, flessibilità e

biocompatibilità., che li rendono particolarmente adatti a queste applicazioni. In particolare, vengono utilizzati grafene e nanotubi di carbonio.

Tuttavia, a differenza dei polimeri, le attuali conoscenze sulle interazioni biologiche dei nanomateriali a base di carbonio *in vivo* sono ancora lacunose e necessitano di ulteriori studi.

Il grafene è un allotropo del carbonio costituito da un singolo strato di atomi di carbonio disposti in un reticolo esagonale 2-dimensionale. Conduce efficacemente calore ed elettricità, è quasi trasparente, battericida e antivirale ed è altamente biocompatibile con bassa tossicità cellulare. Sono stati riscontrati fenomeni di tossicità nell'utilizzo di fogli di grafene; pertanto, in questo ambito viene preferibilmente impiegato per la realizzazione di scaffold 3D elettricamente conduttivi, che invece stimolano e accelerano la differenziazione e la proliferazione delle cellule staminali neurali umane e sono in grado di incapsulare diverse nanoparticelle.

Può anche essere impiegato sotto forma di nanogriglie, che permettono di aumentare il rapporto tra cellule neurali e cellule gliali grazie a tecniche di stimolazione biocompatibili, come la stimolazione elettrica o laser pulsata.

I nanotubi di carbonio (Carbon Nano Tubes, CNT) sono allotropi del carbonio con una struttura cilindrica cava, con le estremità ricoperte da una cupola fullerenica. Queste strutture sono caratterizzate da straordinaria conduttività termica e proprietà meccaniche ed elettriche ottimali. Essi vengono funzionalizzati con vari gruppi chimici in modo da promuovere la crescita dei neuriti, e interessano principalmente il trattamento di lesioni al SNC [47].

2.6 Nanoparticelle

Come sopra accennato, la barriera emato-encefalica (BBB) interferisce con il passaggio dei farmaci al cervello e questo comporta la necessità di dosi sistemiche più elevate per raggiungere i livelli terapeutici necessari, con effetti avversi per l'organismo. Pertanto, si rende necessario individuare delle tecniche per migliorare la somministrazione dei farmaci al SNC.

In questo contesto le nanoparticelle (NanoParticles, NP) sono una delle nanostrutture più performanti grazie alle piccole dimensioni, alla ampia superficie e ai rapporti superficie/volume ottimali. Possono essere composte da diversi materiali come ceramici, metalli, ossidi, sali e polimeri. Le nanoparticelle polimeriche sono ampiamente sfruttate dall'ingegneria tessutale in quanto rappresentano un sistema di somministrazione di farmaci ottimale e versatile: sono in grado di proteggere gli agenti terapeutici, attraversare la barriera emato-encefalica (BBB) e fornire efficacemente farmaci nelle aree danneggiate (Figura 2.3) [21].

Le NP di silice, in particolare le NP di silice mesoporosa con una dimensione dei pori di 2-50 nm, sono le più frequentemente utilizzate nel trattamento delle malattie neurodegenerative a

causa della loro grande superficie e volume dei pori; inoltre, è facile controllare le loro dimensioni e hanno una buona biocompatibilità.

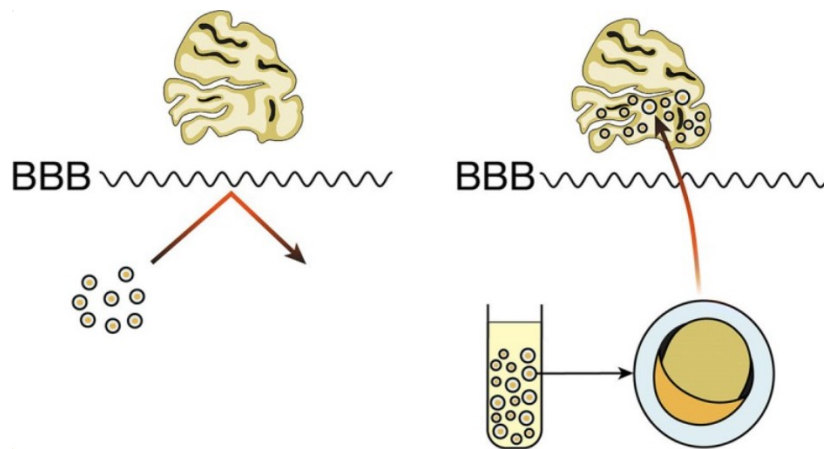


Figura 2.3: i farmaci terapeutici non rivestiti non sono in grado di attraversare la BBB, mentre le nanoparticelle polimeriche li proteggono, permettendo loro di attraversare la BBB e fornire efficacemente gli agenti terapeutici alle aree danneggiate.

2.7 Nanofibre

Nel tessuto nervoso, l'assone può essere considerato come un fascio di fibre avvolto da cellule di supporto. Anche le fibre di collagene e i capillari hanno una struttura simile a un fascio, importante non solo per la sopravvivenza e la funzione neuronale, ma anche per la guida del contatto nella trasmissione del segnale.

Per imitare la struttura fibrosa del tessuto cerebrale, viene utilizzata la tecnica dell'elettrofilatura al fine di produrre nanofibre di vari materiali polimerici: è un processo mediante il quale un polimero in soluzione o fuso può essere filato, grazie ad un campo elettrico ad alto potenziale. Tale tecnica viene applicata in virtù della sua semplicità, riproducibilità e diversità nella produzione di fibre con vari diametri e con diverse caratteristiche topografiche.

Uno dei principali vantaggi dell'utilizzo di nanofibre elettrofilate è l'ampio rapporto superficie-area/volume, che le rende una matrice bioattiva ottimale per l'attaccamento cellulare, il carico molecolare e la funzionalizzazione. Esse migliorano le caratteristiche biochimiche e biofisiche dei tessuti in cui vengono impiantate, favorendone la rigenerazione.

Una caratteristica fondamentale che le nanofibre devono avere è il corretto allineamento, rendendole particolarmente utili come guida topografica per la ricrescita degli assoni. Infatti, uno studio [48] ha testato l'effetto di entrambe le nanofibre (sia allineate e che casuali) sulle cellule di Schwann e sulla proliferazione, trovando un effetto migliorato se allineate.

2.8 Peptidi autoassemblanti

I peptidi autoassemblanti (Self-Assembling Peptides, SAPs) sono sequenze di amminoacidi che si assemblano per formare nanostrutture come tubi, bastoncelli e fogli, consentendo la presentazione della funzionalità chimica dei peptidi sulla superficie di queste strutture. Essi presentano una serie di caratteristiche funzionali al processo di auto-assemblaggio, come:

- lunghe code idrofobiche che si aggregano in soluzioni acquose
- residui consecutivi di cisteina che permettono la formazione di ponti di disolfuro
- residui di glicina che forniscono flessibilità al peptide
- residui di serina fosforilata che permette l'interazione con ioni calcio
- ligandi RGD che migliorano l'adesione cellulare

Il processo di auto-assemblaggio comporta diverse attività fisico-chimiche e biochimiche a seconda della morfologia, delle dimensioni e dell'accessibilità della superficie attiva e può essere controllata da pH, forza ionica, temperatura o trigger enzimatici.

Inoltre, quando vengono messi insieme più assemblaggi, è possibile stabilire una rete supramolecolare. I vantaggi di queste strutture sono la loro biocompatibilità e la facilità di sintesi.

Esistono diversi tipi di peptidi autoassemblanti:

- i dipeptidi sono gli elementi costitutivi più semplici di queste strutture, possono assemblarsi in strutture ordinate nell'ordine su scala nanometrica;
- i peptidi tensioattivi sono 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 molecole presenti sullo strato lipidico delle cellule;
- i peptidi ionico-complementari sono caratterizzati da una disposizione alternata di residui caricati negativamente e positivamente;
- i peptidi ciclici sono composti da amminoacidi che formano una struttura cilindrica.

Capitolo 3: Fabbricazione degli scaffold

3.1 Criteri di progettazione

Lo scopo dell'ingegneria tissutale è quello di regolare la coltura cellulare tridimensionale per supportare la rigenerazione tissutale tramite la progettazione e lo sviluppo di analoghi sintetici della matrice extracellulare, gli scaffold. Come già sottolineato è di fondamentale importanza che gli scaffold imitino quanto più possibile l'ambiente autologo affinché la rigenerazione neuronale sia efficace. In quest'ottica, le proprietà ideali di uno scaffold per la rigenerazione nervosa sono la biocompatibilità, la biodegradabilità e la porosità per permettere la vascularizzazione e la migrazione cellulare. Inoltre, le matrici tridimensionali devono avere proprietà meccaniche appropriate per imitare la matrice extracellulare (Figura 3.1) [49].

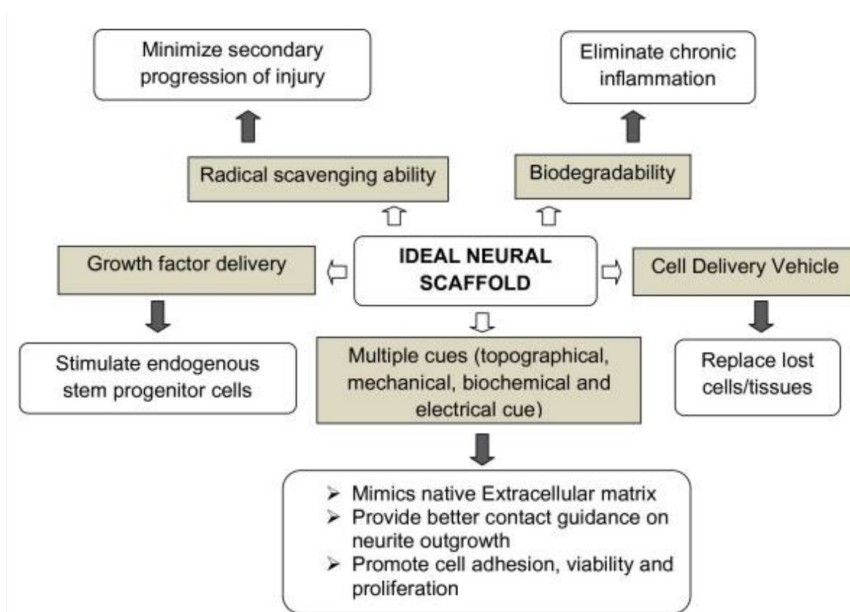


Figura 3.1: proprietà e funzioni ideali di uno scaffold [49].

3.1.1 Biocompatibilità e biodegradabilità

La prima e fondamentale caratteristica da considerare nella fabbricazione di uno scaffold è la sua biocompatibilità, poiché il biomateriale deve supportare le funzioni cellulari sia delle cellule native che di quelle trapiantate, permettendo la formazione di interazioni dirette con il tessuto autologo. Pertanto, quando il biomateriale entra in contatto con il tessuto autologo non dovrebbe dare luogo a reazioni indesiderate o di rigetto da parte dell'organismo ospite. Inoltre, è importante ricordare che l'interazione dei biomateriali con l'organismo è sempre un processo bidirezionale: ogni materiale quando viene impiantato provoca una reazione da parte

dell'organismo ma allo stesso tempo subisce un effetto prodotto dall'interazione con lo stesso. Da questo punto di vista si possono suddividere i biomateriali in biodegradabili e biostabili.

I materiali biodegradabili, come possono essere alcuni polimeri, sono quelli che subiscono significative trasformazioni chimiche o fisiche quando entrano a contatto con l'ambiente biologico, ad esempio la diminuzione del peso molecolare con conseguente modifica delle caratteristiche meccaniche [2]. È importante prestare attenzione al fatto che non solo i biomateriali ma anche i prodotti della loro degradazione siano non tossici, non immunogenici e non cancerogeni. In questo caso, i biomateriali sono definiti biorisorbibili. Questo tipo di materiali può essere particolarmente utile perché evita la necessità di un secondo intervento chirurgico per eliminare l'impianto una volta esaurito il suo ruolo, intervento che nel caso della rigenerazione neurale può essere dannoso se le cellule trapiantate hanno stabilito connessioni neurali e si sono integrate con il tessuto ospite. In quest'ottica anche il tasso di degradazione è funzionale al successo della rigenerazione. Idealmente, il tasso di degradazione del materiale dovrebbe corrispondere strettamente al tasso di rigenerazione tessutale: lo scaffold dovrebbe rimanere intatto affinché le cellule trapiantate secernano nuova matrice extracellulare e gli assoni si rigenerino, e poi degradarsi man mano che il tessuto autologo rimpiazza l'innesto, senza emettere prodotti di degradazione citotossici.

Ad esempio, i condotti di guida nervosa (NGC), che collegano le estremità distale e prossimale di un nervo lesionato, dovrebbero mantenere la loro forma, attendere che l'assone cresca dal moncone prossimale attraverso il difetto e rinnervare la via del nervo distale, quindi iniziare a degradarsi gradualmente e ridurre al minimo la pressione sui tessuti circostanti. Se il tasso di degradazione è troppo veloce, può causare un'inflammatione locale, mentre se è troppo lento l'NGC comprime il nervo, causando danni allo stesso [50].

Si definiscono biostabili quei materiali che a contatto con l'ambiente biologico mantengono intatte le loro caratteristiche e pertanto sono specialmente indicati per situazioni in cui è richiesto l'isolamento immunitario di cellule allogene e xenogene. In tal caso bisogna comunque prestare particolare attenzione al fatto che l'impianto a lungo termine non causi una risposta cronica da corpo estraneo [49].

3.1.2 Proprietà meccaniche

Le cellule trapiantate richiedono un supporto strutturale e le proprietà meccaniche di tale supporto possono influenzare la sopravvivenza cellulare, la differenziazione e di conseguenza il potenziale rigenerativo. Nel caso del SNC non è necessario che lo scaffold impiantato resista a sollecitazioni particolarmente elevate ma sue proprietà come rigidità e flessibilità devono

essere simili a quelle del tessuto nervoso e dei tessuti circostanti per evitare danni meccanici a questi tessuti in seguito all'innesto.

Invece le NCG nel PNS dovrebbero avere un elevato grado di protezione anti-compressione per sostenere lo stress fisiologico, oltre che un certo grado di flessibilità per resistere alle forze di trazione e torsione generate durante le attività degli arti, proteggendo così i nuovi assoni e favorendo la rigenerazione [50].

3.1.3 Porosità

La permeabilità e la porosità giocano un ruolo cruciale nel determinare la funzionalità dello scaffold, influenzando in modo significativo la crescita e il comportamento delle cellule trapiantate. Infatti, i pori permettono la vascolarizzazione della struttura, consentono lo scambio di ossigeno, nutrienti e altri fattori, un drenaggio rapido degli essudati delle lesioni nervose e l'allineamento delle cellule neurali. Inoltre, essi consentono le infiltrazioni delle cellule ospiti ed evitano invece le infiltrazioni di quelle che formano il tessuto cicatriziale fibrotico.

Per quanto riguarda il PNS, è stato dimostrato che le NCG porose migliorano notevolmente la rigenerazione nervosa rispetto a quelle impermeabili, che a causa dell'apporto di nutrienti ostacolano la crescita. Anche la dimensione dei pori influenza il tasso di rigenerazione tessutale. Uno studio [51] ha realizzato NCG con pori superficiali di diverse dimensioni e strutture, dell'ordine sia dei nanometri sia dei micrometri, per valutare l'effetto sulla rigenerazione nervosa utilizzando un modello di difetto del nervo sciatico dei ratti. Ne è risultato che i pori di dimensioni nanometriche (~100 nm) permettono una rigenerazione nervosa ottimale, prevenendo l'infiltrazione di tessuti fibrosi e consentendo la permeabilità selettiva della membrana della NCG: hanno permesso la crescita e il collegamento di un assone tra i suoi monconi prossimali e distali in 4 settimane. Al contrario pori micrometrici (~200 µm) hanno impedito la rigenerazione nervosa e rallentato la crescita assonale.

3.1.4 Guide topografiche

Oltre ai pori anche altri segnali topografici nanostrutturati ben definiti come solchi, creste, nodi possono influenzare l'interazione cellula-substrato guidando l'adesione, la migrazione, la proliferazione e la differenziazione cellulare in un nuovo tessuto [49].

Soprattutto nel trattamento delle lesioni del sistema nervoso centrale (SNC), diversi esperimenti hanno dimostrato che l'utilizzo di biomateriali strutturati in maniera lineare produce risultati molto promettenti rispetto agli innesti non organizzati. Infatti, negli scaffold privi di un'organizzazione tridimensionale, la crescita degli assoni segue un percorso casuale,

compromettendo l'organizzazione tipica in fasce. Di conseguenza, si verifica una significativa diminuzione del numero di neuroni capaci di stabilire connessioni funzionali con i rispettivi recettori situati oltre la sede della lesione. Pertanto, vi è la necessità di un'adeguata guida topografica per la crescita degli assoni, come microscanalature alternate e canali allineati parallelamente all'interno dello scaffold [52].

Anche nelle NCG sono essenziali dei microcanali che non solo supportino la crescita degli assoni, ma influenzino la loro morfologia e funzione. Anche in questo caso bisogna prestare attenzione alle dimensioni di questi microcanali in quanto un diametro troppo piccolo impedisce la crescita dei vasi sanguigni e l'efficace scambio di nutrienti nelle NGC, che non favorisce la rigenerazione nervosa: attualmente si ritiene che un diametro di 20-30 μm sia appropriato ma sono necessarie ulteriori ricerche [50].

3.1.5 Struttura superficiale

Anche le proprietà superficiali dello scaffold influenzano la crescita e la differenziazione delle cellule. Ad esempio, una superficie dalla rugosità elevata (rugosità media compresa fra 85 e 200nm) supporta la generazione di assoni più lunghi e più rami dei neuriti rispetto ad una rugosità media superficiale inferiore, ad esempio di 6-50 nm. Inoltre, le superfici idrofiliche mostrano un più alto tasso di adesione cellulare e tendono ad adsorbire più proteine. Se invece l'idrofilicità superficiale diminuisce, aumenta il tasso di diffusione dei neuroni e la crescita dei neuriti. Pertanto, è molto importante progettare attentamente il microambiente superficiale degli scaffold ingegnerizzati dal tessuto nervoso [50].

3.2 Tecniche tradizionali di fabbricazione

La creazione di componenti di ingegneria tessutale ha attraversato un lungo processo e negli anni sono stati sviluppati diverse tecniche di bio-fabbricazione per creare strutture complesse a partire da componenti sia naturali sia sintetiche; ciascuna di queste tecniche è in grado di fornire una diversa gamma di forme e strutture per soddisfare le esigenze e i requisiti dell'applicazione corrispondente e presenta vantaggi e svantaggi [53].

3.2.1 Solvent casting/Particulate Leaching

La colata con solvente è il più tradizionale metodo impiegato per la fabbricazione di strutture porose. In questa tecnica una soluzione polimerica omogenea contenente un qualche tipo di porogeno, come sale, zucchero e cera, viene versata in uno stampo, tipicamente in Teflon o acciaio inossidabile, e il solvente viene lasciato evaporare. Il polimero solidifica per

evaporazione del solvente e ne risulta un materiale composito contenente sia il polimero che i porogeni. Infine, tale materiale viene immerso in un bagno in modo che i porogeni si dissolvano lasciando una struttura porosa che può essere utilizzata in varie applicazioni di ingegneria tessutale (Figura 3.2).

Questo metodo permette di controllare ed ottimizzare la porosità dello scaffold risultante sia attraverso l'uso di diversi tipi, forme e dimensioni dei porogeni, sia attraverso la concentrazione degli stessi. Inoltre, è particolarmente utile il fatto che questi stampi possano contenere dei fili per creare canali o altri tipi di microstrutture interne. Infine, sfruttando la perfusione di particelle porogene o combinando più tipi di porogeni è possibile anche controllare l'interconnettività dei pori.

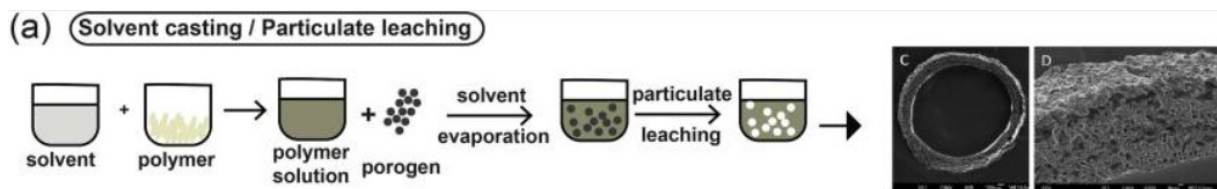


Figura 3.2: schematizzazione del metodo di fabbricazione 'solvent casting/Particulate leaching'.

3.2.2 Liquid phase separation

La separazione di fase può essere distinta in due categorie a seconda del metodo di fabbricazione utilizzato: separazione di fase non indotta da solvente (non-solvent-induced phase separation, NIPS) e separazione di fase indotta termicamente (thermally induced phase separation, TIPS) (Figura 3.3).

La NIPS richiede un polimero, un solvente e un non solvente. La soluzione polimerica omogenea contenente il solvente viene prima colata su una struttura di supporto adatta, poi esposta all'aria per un breve periodo di tempo ed infine immersa in un bagno contenente la soluzione non solvente. L'interazione fra il solvente e il non solvente porta alla formazione di due fasi che si creano a causa della precipitazione del polimero: una fase è ricca di polimero, l'altra è povera di polimero. Man mano che la prima fase si arricchisce di polimero, si va a creare la struttura porosa. Gli scaffold costruiti con questo metodo solitamente hanno strutture porose eterogenee, pertanto hanno applicazioni limitate nell'ingegneria tessutale.

La TIPS invece richiede una soluzione polimerica in un solvente omogeneo, capace di sublimare facilmente, come il naftalene o il fenolo. Il raffreddamento al di sotto del punto di fusione del solvente di questa soluzione omogenea ne comporta la separazione in due fasi, una

ricca e l'altra povera di polimero. La fase ricca di polimero solidifica, creando la matrice dello scaffold, mentre quella povera lascia i pori quando viene rimosso il solvente.

Per rimuovere il solvente si usano due metodi: la separazione di fase solido-liquido (S-L) sfrutta l'abbassamento delle temperature per indurre la cristallizzazione del solvente; la rimozione dei cristalli poi comporta la formazione dei pori. Invece la separazione di fase liquido-liquido (L-L) avviene ad una temperatura critica, superiore a quella di cristallizzazione, in cui vi è la coesistenza delle due fasi. La separazione di esse porta alla formazione della struttura porosa. Con questo approccio risulta però difficile mantenere costante il diametro e il verso delle fibre polimeriche, pertanto è poco utilizzato.

La morfologia dello scaffold risultante dipende da diversi parametri come la concentrazione della soluzione, il metodo e i tempi di raffreddamento, il rapporto solvente/non solvente e la presenza di surfattanti che possono ridurre la tensione sulla superficie di separazione tra le fasi, incrementare la dimensione dei pori e la loro interconnessione. Grazie alla possibilità di controllare la porosità e la dimensione dei pori attraverso questi parametri, tale tecnica è molto diffusa nonostante richieda l'utilizzo di solventi organici, che possono essere nocivi per le cellule.

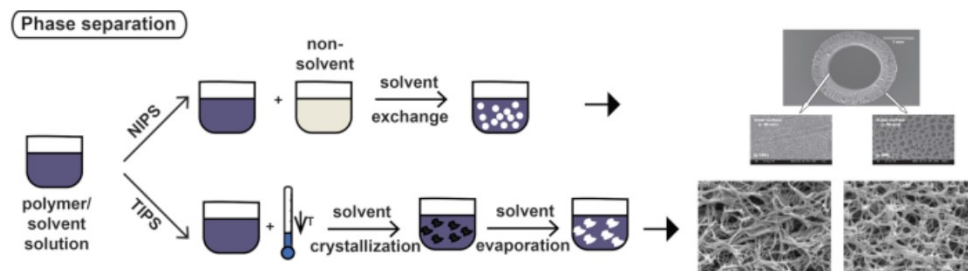


Figura 3.3: schematizzazione del metodo di fabbricazione 'Liquid phase separation'.

3.2.3 Self-Assembly

La tecnica di self-assembly, o autoassemblaggio, consiste nell'organizzazione spontanea di componenti in strutture ordinate, senza la necessità di un'istruzione esterna, grazie all'instaurarsi di legami non covalenti, come forze di Van Der Waals, legami a idrogeno e forze elettrostatiche. Sebbene tali interazioni individualmente siano piuttosto deboli, il loro insieme porta alla formazione della matrice e influenza la sua interazione con le altre molecole.

Questa tecnica è ampiamente utilizzata per la fabbricazione di nanofibre che imitano fedelmente la struttura della matrice extracellulare: il loro diametro è di almeno due ordini di grandezza più piccolo rispetto a quello delle fibre prodotte mediante elettrofilatura.

Per questo metodo vengono utilizzate molecole biologiche, ad esempio peptidi anfifilici, o auto-assemblanti. Essi iniziano ad auto-assemblarsi in base alla regolazione di determinati parametri come luce, pH, temperatura, concentrazione di ioni in soluzione e presenza o assenza di un agente riducente o ossidante. Essi formano idrogel con vari tipi di nanofibre e reti su scala nanometrica che però presentano scarsa stabilità meccanica; inoltre, molto spesso si verifica la formazione incontrollata di macro-pori. A causa di questi problemi e dell'elevato costo per la sintesi dei peptidi autoassemblanti, le applicazioni del self-assembly nell'ingegneria tessutale sono ancora piuttosto limitate.

3.2.4 Gas Foaming

Questa tecnica, detta anche schiumatura di gas, non richiede alte temperature o solventi organici ma la formazione di gas in una soluzione polimerica. Le particelle di polimero, solitamente PGA o PLGA, vengano mescolate con un agente porogeno e con piccole quantità di acqua deionizzata. Tale miscela viene posta in appositi stampi dove viene pressurizzata iniettando CO₂ a circa 55 atmosfere per 12-16 ore. Dopodiché la pressione di CO₂ viene diminuita rapidamente fino a raggiungere il valore della pressione atmosferica, provocando instabilità termodinamica che causa la nucleazione e la formazione di bolle di gas all'interno del polimero. Il porogeno viene poi eliminato immergendo lo scaffold in acqua distillata per circa 4 ore (Figura 3.4).

Attraverso questo processo, la dimensione delle bolle che si formano varia da 100 µm a 500 µm, formando pori della stessa dimensione all'interno del polimero.

Nonostante sia una tecnica relativamente semplice e non richieda l'uso di un solvente, a causa del modo in cui si formano le bolle i pori risultano scarsamente connessi. Poiché una rete porosa ben interconnessa è funzionale all'allungamento degli assoni durante il processo di riparazione, questo tipo di scaffold risulta molto difficile da usare nell'ingegneria tessutale. Per questo, le sue applicazioni sono ancora estremamente limitate.

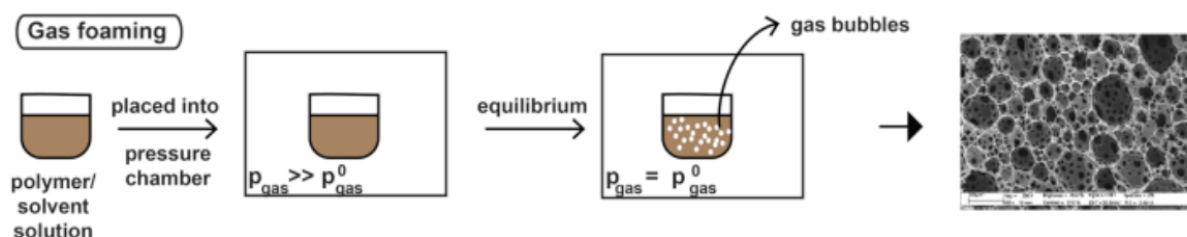


Figura 3.4: schematizzazione del metodo di fabbricazione 'gas foaming'.

3.2.5 Freeze-drying

Il freeze-dry, o liofilizzazione, è una tecnica relativamente semplice usata per produrre scaffold altamente porosi senza la necessità di un agente porogeno. Essa sfrutta l'acqua presente all'interno del polimero: la soluzione polimerica viene raffreddata fino a giungere a bassa temperatura (-70/-80 °C) causando la formazione di micro-cristalli di ghiaccio dal solvente. Conseguentemente il polimero tende ad aggregarsi in tutti gli spazi vuoti creatisi intorno ai cristalli. Questi ultimi vengono successivamente rimossi tramite sublimazione, portando alla formazione di scaffold asciutti con pori interconnessi. L'eventuale presenza di acqua residua non congelata viene rimossa in un processo di essiccazione secondaria (Figura 3.5).

Il processo con cui avviene il congelamento dell'acqua nel polimero è cruciale nella definizione delle proprietà meccaniche e strutturali dello scaffold che si sta realizzando, in quanto queste ultime dipendono dalla morfologia e dal numero di cristalli di ghiaccio. Variando la temperatura, e quindi la velocità di congelamento, si possono variare anche le dimensioni dei pori negli scaffold: più le temperature sono basse, più l'acqua congela rapidamente e forma cristalli, e quindi pori, di diametro inferiore.

Gli scaffold prodotti attraverso tale tecnica sono stati ampiamente utilizzati per la rigenerazione nervosa poiché la buona interconnettività dei pori ottenuta attraverso questo metodo di fabbricazione è ideale per promuovere l'infiltrazione cellulare e la crescita dei tessuti.

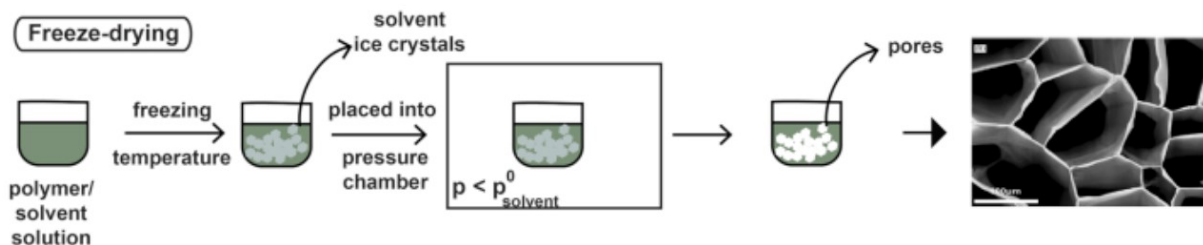


Figura 3.5: schematizzazione del metodo di fabbricazione 'Freeze-drying'.

3.2.6 Hydrogel formation

Come già visto, gli idrogel sono reti polimeriche altamente idrofiliche con la capacità di incorporare grandi quantità di acqua nelle loro strutture e ricoprono un ruolo importantissimo nell'ingegneria tessutale. Per crearli si parte da soluzioni liquide di catene polimeriche di varie dimensioni, contenenti monomeri e composti reticolanti per favorirne la reticolazione. Tale processo può avvenire in vari modi, dalla fotopolimerizzazione UV e dalla reticolazione dipendente dalla concentrazione ionica, ai cambiamenti nella temperatura o nel pH del materiale. A seconda del tipo e delle proprietà del materiale polimerico e del metodo di

reticolazione utilizzato, gli idrogel possono variare le loro proprietà. Nell'ambito della rigenerazione nervosa, l'obiettivo è creare idrogel morbidi e flessibili che imitino i tessuti molli del cervello. I cambiamenti che possono verificarsi nella porosità e rigidità o flessibilità dell'idrogel risultante svolgono un ruolo cruciale nel modo in cui gli idrogel interagiscono con le cellule.

3.2.7 Electrospinning

Questo processo, noto come elettrofilatura, è un metodo elettrodinamico di fabbricazione degli scaffold che si basa sull'attrazione elettrostatica di un liquido che, uscendo da un ugello, viene sottoposto ad un campo elettrico e poi raccolto su piastra.

L'elettrofilatura utilizza una sorgente ad alta tensione (di solito nell'intervallo dei kilovolt) per applicare una elevata differenza di potenziale fra la punta di una siringa, contenente un fluido polimerico viscoelastico, sotto forma di soluzione o di fuso, e un collettore. Il fluido così elettrostaticamente caricato viene quindi accelerato verso il collettore e la siringa forza il suo passaggio attraverso un ago metallico. Man mano che l'attrazione elettrostatica tra il liquido e il collettore, di cariche opposte, e le repulsioni elettrostatiche tra cariche simili nel liquido diventano più forti, la superficie del fluido sulla punta dell'ago cambia formando il cosiddetto cono di Taylor. Quando l'intensità del campo elettrico supera la tensione superficiale del liquido, un getto di fibra viene espulso dal cono di Taylor. Tale getto viaggia attraverso l'atmosfera permettendo al solvente di evaporare, causando così la deposizione di fibre polimeriche solide sul collettore (Figura 3.6) [55].

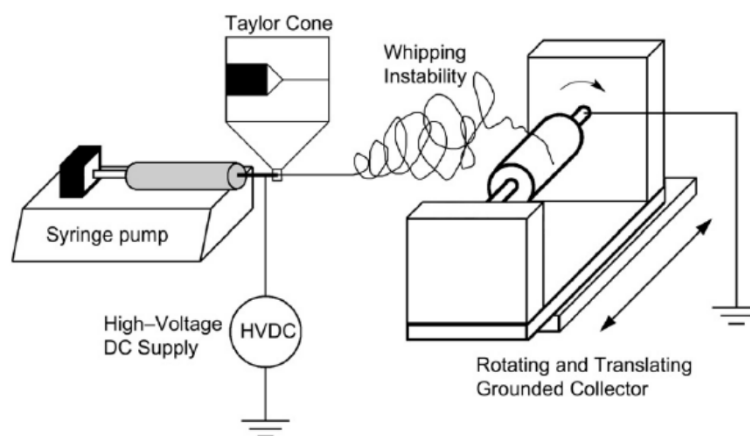


Figura 3.6: schematizzazione di un apparato di elettrofilatura.

Le fibre prodotte con questo processo hanno tipicamente diametri dell'ordine di pochi micrometri fino alle decine di nanometri e presentano struttura solida. Tuttavia, negli ultimi anni sono state esplorate due strategie per generare nanofibre porose: si rimuove selettivamente uno dei componenti delle fibre oppure si induce la separazione di fase polimero-solvente, raffreddando rapidamente le fibre prima della completa solidificazione. Entrambi gli approcci sono ugualmente validi e vengono utilizzati per ottenere nanofibre porose da una grande varietà di polimeri.

La struttura finale delle fibre prodotte è solitamente un tessuto orientato in modo causale: per ottenere fibre allineate si possono sfruttare metodi di diversa natura. L'approccio meccanico prevede un mandrino rotante che permette di allineare le fibre lungo la direzione della rotazione; quello magnetico sfrutta l'incorporazione di nanoparticelle magnetiche nella soluzione polimerica per poi magnetizzarla. In questo modo le fibre magnetizzate vengono allungate e poste parallelamente per generare una matrice allineata uniassialmente. Infine, l'approccio elettrostatico consiste in una coppia di elettrodi con uno spazio isolante nel mezzo che porta all'allungamento e allineamento delle fibre in direzione perpendicolare a ciascun bordo della fessura.

Nonostante l'elettrofilatura sia un metodo abbastanza semplice, regolando i parametri sperimentali e ambientali e il tipo di polimero utilizzato, si possono influenzare notevolmente le proprietà, la morfologia e le dimensioni delle fibre generate. È proprio questa versatilità, soprattutto la capacità di regolare la dimensione delle fibre, ad essere uno dei punti di forza di questa tecnica, poiché le fibre con diametri dell'ordine dei nanometri imitano fedelmente la scala dimensionale delle proteine fibrose presenti nella matrice extracellulare naturale, come il collagene. Questa capacità è fondamentale in quanto numerosi studi hanno dimostrato che sia la scala dimensionale della struttura che la topografia svolgono ruoli importanti rispettivamente nella proliferazione e nell'adesione cellulare. Pertanto, nell'ultimo decennio si è assistito ad un rinnovato interesse per l'elettrofilatura per applicazioni nell'ingegneria tissutale e nella somministrazione di farmaci [54].

3.2.8 Electrospraying

L'elettrospruzzatura è un altro metodo di metodo elettrodinamico di fabbricazione degli scaffold che si distingue dall'elettrofilatura principalmente per la bassa concentrazione della soluzione polimerica che destabilizza il getto in uscita dal cono di Taylor, portando alla formazione di goccioline fini. Tali goccioline, altamente cariche, non si aggregano bensì si disperdono nello spazio; poi l'evaporazione del solvente nel tempo ne favorisce la contrazione

e la solidificazione, con conseguente deposito di particelle solide sul collettore collegato a terra. Questo metodo permette di produrre goccioline di dimensioni ridotte, controllare la loro distribuzione nello spazio e anche il loro movimento grazie a campi elettrici. La carica e le dimensioni di queste goccioline possono essere controllate tramite la regolazione di portata e tensione applicate all'ugello.

Per applicazioni biomediche è stato sviluppato un approccio alternativo di elettrospruzzatura coassiale che modifica il processo di elettrospray monoassiale utilizzando un ugello capillare coassiale, costituito da un ago esterno e uno interno, per erogare due liquidi tra loro immiscibili in modo indipendente. Due pompe controllano le portate nei rispettivi aghi creando goccioline a due strati utilizzando un campo elettrico.

Elettrofilatura e elettrospruzzatura sono anche state combinate insieme per costruire materiali compositi ibridi in forma di particelle/fibre. Entrambe le tecniche vengono eseguite mediante lo stesso collettore, o simultaneamente o sequenzialmente. In entrambi i casi si ottiene la deposizione di particelle elettrospruzzate sulle superfici delle fibre elettrofilate, generando materiali compositi avanzati utili nel campo della ricerca biomedica per l'ingegneria tessutale.

Capitolo 4: Bioprinting

Il bioprinting è una tecnica di produzione additiva (Additive Manufacturing, AM) definita come l'uso della tecnologia di stampa 3D, o prototipazione rapida (Rapid Prototyping, RP), per fabbricare rapidamente modelli fisici e prototipi in grado di riprodurre accuratamente un qualunque oggetto, anche un tessuto biologico. Indipendentemente dalla tecnologia utilizzata, il principio alla base è la deposizione successiva di strati 2D di materiale sovrapposti l'uno all'altro fino a creare un intero oggetto tridimensionale.

La stampa 3D ha attirato molta attenzione negli ultimi anni in quanto offre diversi vantaggi:

- può essere combinata con la tecnologia di imaging 3D per ottenere elevata precisione anatomica e personalizzare la forma dello scaffold, in modo che la struttura del tessuto stampato possa adattarsi al microambiente della lesione;
- il controllo robotico permette di raggiungere un'elevata precisione di stampa;
- è compatibile con una varietà di materiali per ottenere funzionalità flessibili;
- può essere combinata con la tecnologia multi-ugello per stampare più materiali contemporaneamente, riducendo i tempi di fabbricazione;
- le repliche anatomiche consentono una accurata pianificazione preoperatoria.

La stampa tridimensionale per applicazioni di ingegneria tissutale può assumere due forme: con e senza cellule viventi incorporate nel costruito. Stampando in 3D una struttura senza cellule, i ricercatori possono sfruttare le tecniche di produzione additiva 3D che richiedono alte temperature o condizioni che sarebbero dannose per le cellule. Alternativamente i bio-inchiostri possono incorporare cellule o incapsulare biomolecole e in questo caso si parla di bioprinting. Stampando contemporaneamente sia cellule che biomateriali si crea una matrice ibrida che può avere adeguate proprietà meccaniche ed essere biocompatibile e contemporaneamente organizzare più tipi di cellule in posizioni specifiche. Tuttavia, tutto ciò risulta molto complesso e fortemente limitato.

In entrambi i casi, prima di stampare, devono essere considerate le caratteristiche di base di un bio-inchiostro come la reticolazione, la viscosità e la gelificazione. Queste caratteristiche hanno un effetto sulla qualità di stampa, sulla morfologia, sulla vitalità cellulare e sulla proliferazione. Generalmente, il sistema di bioprinting 3D comprende un dispositivo di azionamento sugli assi X, Y, Z, un programma di modellazione 3D, computer e materiali adeguati.

Il primo passo è la creazione tramite software di un modello CAD tridimensionale, costruito a partire da scansioni tomografiche. Il modello virtuale dell'oggetto da stampare viene quindi

sezionato (slicing) per comandare la stampa dei piani sovrapposti (Figura 4.1). La fase finale è composta da procedure post-stampa come la finitura finale.

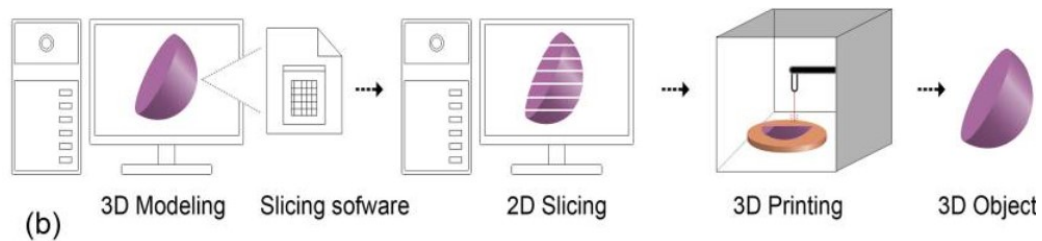


Figura 4.1: stampa 3D.

Secondo i principi di funzionamento, vengono definite diverse tecnologie di bioprinting 3D. Tutti gli approcci possono impiegare varie forme di materiali, liquidi o solidi, e offrono la possibilità di creare strutture 3D altamente organizzate con architetture complesse che non potrebbero essere realizzate tramite i tradizionali processi di produzione. Permettono inoltre di risolvere questioni come porosità interne, riduzione dello stress residuo e forme ad incastro senza connessione.

In generale l'approccio al 3D bioprinting può essere diretto o indiretto. Nella biostampa 3D indiretta viene depositato inizialmente un materiale che compone il negativo dell'oggetto finale. Esso funge da base per lo scaffold, che viene stampato direttamente su di esso insieme alla coltura cellulare designata. Infine, il materiale iniziale viene eliminato attraverso processi chimici o fisici che non intacchino lo scaffold destinato all'impianto. Questo approccio è particolarmente indicato per la realizzazione di strutture porose.

La biostampa 3D diretta, invece, forma lo scaffold senza l'utilizzo di un negativo. Esistono diverse procedure volte a raggiungere tale obiettivo: le più comuni utilizzano un ugello, il cui movimento è regolato dal computer, per la deposizione del materiale, mentre le più innovative si basano sulla scrittura laser diretta.

In questo capitolo si propone una revisione delle più diffuse tecniche di bioprinting diretto, approccio favorito dall'ingegneria tessutale per la rigenerazione del tessuto neurale [59,60,61,62,63].

4.1 Bioprinting a getto d'inchiostro

La bioprinting a getto d'inchiostro è una tecnica economica che consente la deposizione simultanea e senza contatto di cellule in determinate direzioni a risoluzioni micrometriche (Figura 4.2). Con questa tecnologia goccioline di biomateriali vengono posizionate

selettivamente sulla piattaforma strato su strato fino a creare una struttura completa. Le principali stampanti a getto d'inchiostro sfruttano forze termiche o piezoelettriche.

Nelle stampanti termiche a getto d'inchiostro, la temperatura fornita alla stampante prevede il riscaldamento dell'ugello di stampa: nel biomateriale si forma una bolla d'aria che causa un impulso di pressione che consente l'espulsione delle goccioline. Il riscaldamento localizzato necessario non sembra impattare in maniera sostanziale sulla stabilità o funzionalità delle molecole biologiche e delle cellule. Questo metodo consente un'elevata velocità di stampa e una risoluzione compresa tra 20 e 100 μm .

Nella stampa piezoelettrica a getto d'inchiostro, le goccioline si formano applicando un attuatore piezoelettrico. La tensione applicata eccita il cristallo piezoelettrico, che si trova nella testina della stampante. La velocità e la dimensione delle goccioline espulse possono essere determinate controllando fattori come il tempo, la frequenza dell'impulso e l'ampiezza degli attuatori. Rispetto alla stampa termica, questo metodo permette un tasso maggiore di sopravvivenza cellulare perché il bio-inchiostro non è esposto al calore e alla pressione che possono causare danni alle cellule.

Uno svantaggio del bioprinting a getto d'inchiostro è che i tipi di biomateriali utilizzati in questa tecnica non presentano viscosità elevata, cosa che spesso si traduce in scarse proprietà meccaniche che rendono difficile mantenere intatta la forma dello scaffold in seguito alle sollecitazioni dopo l'impianto. Inoltre, le piccole dimensioni degli ugelli limitano il volume accumulato per goccia (<10 pL). Ciò significa che alte concentrazioni cellulari (>5 milioni di cellule / ml) devono essere seminate per massimizzare la probabilità che ogni goccia di bioink contenga una cellula, ovvero la densità cellulare che può essere stampata utilizzando la tecnologia di bioprinting è bassa.

Infine, per quanto il bioink possa essere ben miscelato inizialmente, durante il processo di stampa le cellule iniziano a precipitare nella cartuccia, aumentando così la densità dell'inchiostro, con conseguenti potenziali ostruzioni dell'ugello.

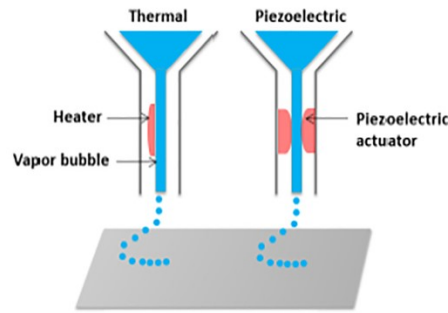


Figura 4.2: schematizzazione del bioprinting a getto d'inchiostro.

4.2 Bioprinting basato sulla (micro)estrusione

Tra tutte le tecniche di bioprinting 3D esistenti, la stampa basata sull'estrusione è la tecnica più utilizzata (Figura 4.3). Essa consiste nell'estrusione di un flusso continuo di bio-inchiostro su strati sovrapposti. I biomateriali vengono erogati attraverso aghi, basandosi sulle istruzioni fornite dal software CAD per impilare il materiale sotto forma di perline su un substrato: in primo luogo, le perline vengono posizionate nella direzione X-Y, dopodiché la testa dell'estrusore viene spostata lungo l'asse Z per creare una complessa struttura 3D. Di conseguenza, rispetto alla stampa a getto d'inchiostro, il materiale stampato è continuo.

I metodi di stampa per estrusione più importanti sono quelli pneumatici o sistemi di distribuzione meccanici, come pistone o vite. La configurazione con deposizione a pistone permette una deposizione più uniforme del bioink, mentre i sistemi a vite consentono un buon controllo spaziale e sono utili per depositare bioink altamente viscosi. Il sistema pneumatico invece è utile per depositare bioink di vario tipo e viscosità, in quanto permette di modulare la pressione di stampa.

Il principale vantaggio del bioprinting per estrusione è la sua capacità di stampare modelli ad altissima densità cellulare che possono fornire un buon supporto. Infatti, poiché non comporta alcun riscaldamento, questa tecnica consente l'incorporazione di cellule e biomolecole all'interno del bioinchiostro e, allo stesso tempo, la stampa continua garantisce una distribuzione ottimale delle cellule nello scaffold.

I successi del metodo ad estrusione lo identificano come l'unico in grado di imitare accuratamente la rigidità del materiale biologico. Quest'ultima importante proprietà è data dalla possibilità di forzare attraverso l'apertura dell'ugello, bioinchiostri che presentano alta viscosità e densità cellulare: sono stampabili bioink con viscosità nell'intervallo $30-10^7$ mPa.

D'altra parte, rispetto al bioprinting a getto d'inchiostro, il bioprinting basato sull'estrusione comporta velocità di stampa e risoluzione inferiori; quest'ultima è limitata a circa $100 \mu\text{m}$.

Lo svantaggio principale di questa tecnica però è la ridotta sopravvivenza cellulare. Infatti, è da tenere in considerazione che alla deposizione tramite estrusione, deve seguire un processo di solidificazione del materiale, che può essere effettuato tramite laser o agenti chimici potenzialmente dannosi per la sopravvivenza delle colture cellulari. Anche la pressione di stampa impatta sulla sopravvivenza delle cellule e pertanto bisogna prestare particolare attenzione alle dimensioni dell'ugello. Infine, il tasso di sopravvivenza cellulare risulta significativamente ridotto all'aumentare delle concentrazioni di bioink, perché l'aumento della viscosità porta ad un aumento dello stress di taglio durante l'estrusione. Tutti questi parametri richiedono un fine bilanciamento della strumentazione e delle biomolecole addizionate in vitro, per modulare la sopravvivenza delle cellule sullo scaffold, che può spaziare fra il 40% e il 90%, se vengono ottimizzati.

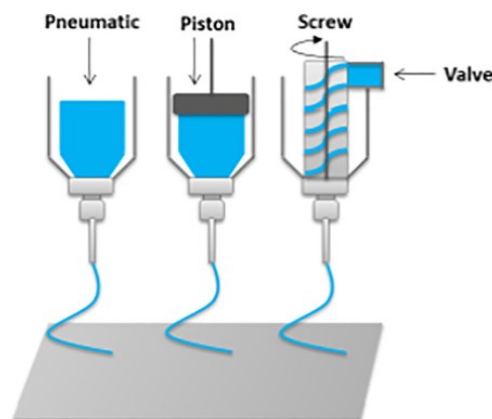


Figura 4.3: schematizzazione del bioprinting basato sull'estrusione.

4.3 Laser-assisted bioprinting

La tecnica LIFT Laser-assisted bioprinting è una tecnologia di Bioprinting 3D che sfrutta l'energia luminosa (Figura 4.4). Un laser pulsato altamente focalizzato colpisce un piano, detto assorbente, di vetro o metallo. Il piano assorbe la radiazione e crea bolle ad alta pressione nel substrato adiacente, detto piano donatore. Quest'ultimo, per effetto delle bolle, rilascia gocce di bioink che vanno poi a depositarsi sul substrato ricevente per formare lo scaffold. È una tecnica performante in quanto i valori di viscosità tipici del bioink prodotto con questo metodo di stampa sono elevati e gli scaffold possono essere stampati con una precisione fino a 10 μm . Permette inoltre di depositare cellule ad una densità fino a 10^8 cellule/mL e può raggiungere un'ottima risoluzione di stampa, di una sola cellula per goccia.

Poiché si tratta di un processo di stampa senza ugelli, la deposizione del bioink è continua, senza interruzione fra strati e senza problemi di ostruzione degli ugelli.

D'altra parte, LIFT presenta anche degli svantaggi: in primo luogo per ottenere un'elevata fedeltà della forma, a causa dell'alta risoluzione della stampa, sono necessari tempi di stampa più lunghi e un flusso di stampa inferiore. In secondo luogo, non è possibile stampare più tipi di cellule e materiali contemporaneamente a causa delle limitazioni della struttura di tali apparecchiature di stampa: perciò questo metodo può comportare carichi di lavoro onerosi e dispendiosi in termini di tempo. Inoltre, alcuni studi hanno dimostrato che il tasso di sopravvivenza cellulare utilizzando questo metodo di stampa è inferiore all'85%. Ciò può essere dovuto a danni da calore causati dal processo di stampa laser. Il problema della bassa vitalità cellulare è senza dubbio il problema principale.

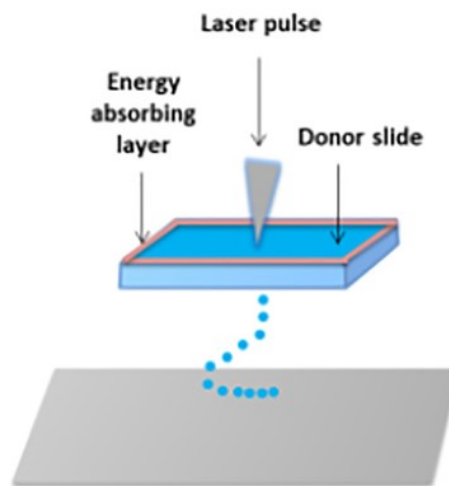


Figura 4.4: schematizzazione del laser-assisted bioprinting.

4.4 Stereolitografia (SLA)

La stereolitografia (SLA) è il metodo di stampa a più alta risoluzione per il bioprinting e si basa sul principio di fotopolimerizzazione di una resina fotosensibile liquida. Consiste in un laser ultravioletto (UV) controllato tramite software, che traccia la superficie di un idrogel o resina in precedenza fotosensibilizzato grazie all'aggiunta di un fotoiniziatore, contenuto in una vasca. L'irradiazione tramite laser fornisce al liquido l'energia necessaria per creare legami covalenti tra le catene polimeriche vicine, e quindi solidificare. Il materiale polimerico fotosensibile spesso polimerizza su materiali di supporto morbidi, che generalmente presentano caratteristiche meccaniche e strutturali simili ai tipi di tessuto neurale, aiutando così la differenziazione delle cellule seminate in sottotipi neuronali.

Al termine della scansione dello strato, il procedimento prevede l'utilizzo di una specie di tergicristallo per spianare la superficie e renderla uniforme. Dopodiché una piattaforma elevatrice spinge la vasca contenente l'idrogel dall'alto verso il basso; quindi, si esegue la scansione dello strato successivo fino ad ottenere un'impalcatura solida tridimensionale completa (Figura 4.5).

Esiste anche un approccio alternativo (CLIP) che attraverso un complesso di micro-specchi dall'inclinazione modulabile individualmente, e permette di polimerizzare tutti i punti del bioink allo stesso tempo. Questo abbassa notevolmente i tempi di produzione ma comporta maggiore fragilità della struttura, oltre alla necessità di elaborazione di una maggiore quantità di dati e quindi un costo più elevato in termini computazionali. Pertanto, è meno utilizzato.

Le prestazioni meccaniche desiderate possono essere ottenute applicando processi di post-trattamento come il riscaldamento o la fotopolimerizzazione a parti fabbricate.

Recentemente altre fonti luminose, come la luce visibile, sono stata prese in considerazione come alternativa alle radiazioni UV, in quanto queste ultime sono dannose per le cellule.

Le bioprinters SLA offrono una risoluzione di stampa molto elevata, che può essere incrementata modificando parametri come la potenza del laser, il tempo di esposizione, le dimensioni dello spot laser, il valore della lunghezza d'onda della luce. Altri vantaggi sono l'alta concentrazione cellulare che può essere utilizzata, l'assenza di problemi dovuta all'intasamento degli ugelli e le complesse architetture che è in grado di sviluppare e che la rendono una promettente alternativa per il bioprinting. Tuttavia, è un metodo lento e costoso e, poiché richiede l'utilizzo di polimeri viscosi fotosensibili, presenta una gamma limitata di bio-ink. Inoltre, la cinetica della reazione e del trattamento di polimerizzazione è complessa. Lo spessore di ogni strato dipende dall'energia della sorgente luminosa e dal tempo di esposizione. Pertanto, la SLA rimane una tecnica poco sfruttata per l'ingegneria dei tessuti neurali: viene utilizzata nella creazione di piccoli modelli di precisione degli organi selezionati e nanocompositi complessi, ma non per veri e propri impianti destinati all'utilizzo clinico.

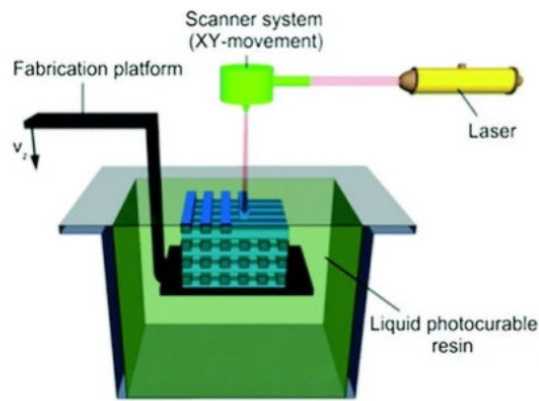


Figura 4.5: schematizzazione stereolitografia (SLA).

4.5 Bioplotting

Il bioplotting è un altro metodo di stampa 3D che ha suscitato grande interesse nel mondo dell'ingegneria tissutale e della biofabbricazione. Si riferisce al processo di estrusione di tubi o sferoidi di materiale da una siringa a pressione, stratificati uno sopra l'altro e polimerizzati dopo la stampa attraverso l'aggiunta di un agente reticolante o mediante radiazioni UV.

Il materiale viene estruso dall'ago di dimensioni micrometriche di una siringa a pressione e distribuito come microfilamento.

Il bioplotter è estremamente versatile perché consente di lavorare dispersioni di polimeri, monomeri o oligomeri reattivi ed è inoltre utilizzabile per la produzione di idrogel. Essendo praticabile già a 37° C, offre inoltre la possibilità di incorporare diverse popolazioni cellulari nelle soluzioni. Attualmente è uno dei metodi più semplici e diffusi per la creazione di scaffold co-coltivati e costrutti tessutali: infatti permette di includere più siringhe per stampare sullo stesso substrato diversi tipi cellulari nella forma desiderata. Questo permette una facile integrazione di più tipi di tessuto nel costrutto finale.

Grazie a queste proprietà, eccelle in particolare nella stampa di scaffold per tessuti molli, come quello nervoso, e nella stampa di organi (ancora in via sperimentale). Inoltre, diverse stampanti in grado di sfruttare questa tecnologia sono disponibili sul mercato, dalle soluzioni open source alle macchine commerciali. D'altra parte, il bioplotting richiede l'uso di biomateriali relativamente viscosi in quanto devono, almeno temporaneamente, sostenersi e mantenere la loro forma dopo l'estrusione dall'ago. Questo tipo di bioink tende, d'altra parte, ad avere caratteristiche meccaniche che limitano le proprietà dello scaffold e la risoluzione, che è inferiore rispetto a quella permessa dalle altre tecniche di stampa.

Conclusioni

L'invalidità causata da patologie o lesioni al sistema nervoso è tra le più drammatiche a causa della perdita delle capacità motorie, di coordinazione, di espressione e pensiero. Considerata la complicata natura anatomica e fisiologica di tale sistema, la terapia risulta essere lunga e complessa e il trattamento spesso invasivo e poco efficace, senza garanzie di un completo ripristino delle capacità neuronali.

In questo contesto l'ingegneria tessutale sta provando a fornire delle soluzioni cambiando completamente l'approccio al problema: dalla tradizionale concezione della medicina per cui ogni paziente viene inteso parte di un gruppo e trattato in modo omogeneo, si osserva una transizione verso un approccio paziente-specifico [64].

Gli scaffold polimerici sono impianti appositamente progettati e realizzati per guidare la rigenerazione tessutale in corrispondenza del sito della lesione. Si tratta di vere e proprie "impalcature" biomimetiche da innestare nel tessuto danneggiato, che richiedono adeguati parametri di biocompatibilità, porosità e permeabilità, nonché buone caratteristiche meccaniche e possibilità di controllo del rilascio di fattori di crescita per le linee cellulari incapsulate al loro interno. Permettono inoltre il trasporto locale di farmaci e fattori terapeutici la cui cinetica di rilascio è molto più efficiente e mirata rispetto alle consuete iniezioni.

Grazie all'avvento della tecnologia del 3D bioprinting, la possibilità di disporre di scaffold integrati con colture cellulari ha aperto una nuova frontiera nella medicina rigenerativa. La riproducibilità, la precisione e la velocità di produzione e i costi contenuti di tale metodo lo rendono sempre più apprezzato e sfruttato in diversi campi di ricerca.

La sfida per il futuro è quindi espandere ulteriormente la conoscenza dei meccanismi con cui i biomateriali così progettati supportano le funzioni cellulari, sperimentandone gli aspetti di biosicurezza ed efficacia, al fine di promuovere con sempre maggior successo la rigenerazione nel sistema nervoso per i casi di lesioni o patologie.

Bibliografia

- [1] Dee. U. Silverthorn, '*Fisiologia umana. Un approccio integrato*', Ottava Edizione, Pearson, 2020, 258-288
- [2] C. Di Bello and A. Bagno, '*Biomateriali: dalla scienza dei materiali alle applicazioni cliniche*', 2. ed. Bologna: Pàtron, 2016, 145-148
- [3] S. Standring, N. Ananad, H. Gray, and H. Gray, Eds., '*Gray's anatomy: the anatomical basis of clinical practice*', 41. ed. Philadelphia, Pa.: Elsevier, 2016, 42-59
- [4] C. Stadelmann, S. Timmler, A. Barrantes-Freer and M. Simons., '*Myelin in the Central Nervous System: Structure, Function, and Pathology*', *Physiological Reviews* Volume 99, Issue 3, 2019 Jul.
- [5] A. Ruczaj and M. Brzóska, '*Environmental exposure of the general population to cadmium as a risk factor of the damage to the nervous system: A critical review of current data*', *Journal of Applied Toxicology*, 2022 March 18, 66-88
- [6] T.M O'Shea, J.E. Burda and M.V Sofroniew, '*Cell biology of spinal cord injury and repair*', *J Clin Invest*, 2017 Sep, 1;127(9):3259-3270.
- [7] M. Bordoni, E. Scarian, F. Rey, S. Gagliardi, S. Carelli, O. Pansarasa and C. Cereda, '*Biomaterials in Neurodegenerative Disorders: A Promising Therapeutic Approach*', *Int J Mol Sci.* ,2020, 21(9): 3243.
- [8] Z. Breijyeh and R. Karaman, '*Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment*', *Molecules*, 2020 Dec, 8;25(24):5789.
- [9] J.M. Beitz, '*Parkinson's disease: a review*', *Front. Biosci. (Schol Ed)* 2014, 6(1), 65–74.
- [10] C. Cotsapas, M. Mitrovic and D. Hafler, '*Neurogenetics, Part II*', Volume 148, Chapter 46-Multiple sclerosis, 2018, 723-730.
- [11] S.L. Hauser SL and B.A.C Cree, '*Treatment of Multiple Sclerosis: A Review*', *Am J Med*, 2020 Dec, 133(12):1380-1390.
- [12] A. Soto, F. Guillén-Grima, G. Morales, S. Muñoz, I. Aguinaga-Ontoso and R. Fuentes-Aspe, '*Prevalence and incidence of ictus in Europe: systematic review and meta-analysis*', *Anales Del Sistema Sanitario De Navarra*, 2022 Apr, 28;45(1):e0979. Spanish.
- [13] J.R. Romero, V.L. Babikian, D.I. Katz and S.P Finklestein, '*Neuroprotection and stroke rehabilitation: modulation and enhancement of recovery*', *Behav Neurol.* 2006;17(1):17-24.

- [14] C.R. Carvalho, J.M. Oliveira and R.L. Reis, '*Modern Trends for Peripheral Nerve Repair and Regeneration: Beyond the Hollow Nerve Guidance Conduit*', *Front Bioeng Biotechnol*, 2019 Nov, 22;7:337.
- [15] D. Grinsell and C.P. Keating, '*Peripheral nerve reconstruction after injury: a review of clinical and experimental therapies*', *Biomed Research International*, 2014, 2014, 698256
- [16] L. Papadimitriou, P. Manganas and A. Ranella and E. Stratakis, '*Biofabrication for neural tissue engineering applications*', *Mater Today Bio*, 2020 Jan 30, 6:100043.
- [17] J. FitzGerald and J. Fawcett, '*Repair in the central nervous system*', *J Bone Joint Surg Br*. 2007;89-B(11):1413-1420.
- [18] T. Yang, Y. Dai, G. Chen and S. Cui, '*Dissecting the Dual Role of the Glial Scar and Scar-Forming Astrocytes in Spinal Cord Injury*', *Front Cell Neurosci*, 2020 Oct 6, 14:270.
- [19] K. Sharma, M.E. Selzer and S. Li, '*Scar-mediated inhibition and CSPG receptors in the CNS*', *Exp Neurol*, 2012 Oct, 237(2):370-8.
- [20] L.A. Hapach, J.A., VanderBurgh, J.P. Miller and C.A. Reinhart-King, '*Manipulation of in vitro collagen matrix architecture for scaffolds of improved physiological relevance*', *Phys Biol*. 2015 Dec;12(6):061002.
- [21] R. Boni, A. Ali, A. Shavandi and A.N. Clarkson, '*Current and novel polymeric biomaterials for neural tissue engineering*', *J Biomed Sci*. 2018 Dec 20;25(1):90
- [22] J.G. Thomson, '*Median and ulnar nerve injuries: A meta-analysis of predictors of motor and sensory recovery after modern microsurgical nerve repair: Discussion*', *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2005;116(2):495–496.
- [23] K.J. Wangensteen and L.K. Kalliainen, '*Collagen tube conduits in peripheral nerve repair: a retrospective analysis*', *Hand (New York)*, 2010 Sept, 5(3):273-7.
- [24] A. Bozkurt, K.G. Claeys, S. Schradling, J.V. Rödler, H. Altinova, J.B. Schulz, J. Weis, N. Pallua and S.G.A. van Neerven, '*Clinical and biometrical 12-month follow-up in patients after reconstruction of the sural nerve biopsy defect by the collagen-based nerve guide Neuromaix*', 2017 Sept, 22;22(1):34.
- [25] D. Ceballos, X. Navarro, N. Dubey, G. Wendelschafer-Crabb, W.R. Kennedy and R.T. Tranquillo, '*Magnetically Aligned Collagen Gel Filling a Collagen Nerve Guide Improves Peripheral Nerve Regeneration*', *Exp Neurol*, 1999, 158:290–300
- [26] J. Cao, C. Sun, H. Zao, Z. Xiao, B. Chen, J. Gao, T. Zheng, W. Wu, S. Wu, J. Wang, and J. Dai, '*The use of laminin modified linear ordered collagen scaffolds loaded*

with laminin-binding ciliary neurotrophic factor for sciatic nerve regeneration in rats, *Biomaterials*. 2011, 32:3939–3948.

- [27] S. K. Seidlits, Z.Z. Khaing, R. Petersen, J.D. Nickels, J.E. Vanscoy, J.B. Shear and C.E. Schmidt, ‘*The effects of hyaluronic acid hydrogels with tunable mechanical properties on neural progenitor cell differentiation*’, *Biomaterials*, 2010, 31(14): 3930–3940.
- [28] A. Shavandi, T.H. Silva, A.A. Bekhit, A.E.A Bekhit, ‘*Keratin: dissolution, extraction and biomedical application*’, *Biomater Sci*, 2017 Aug, 22;5(9).
- [29] Y.C Lin, M. Ramadan, M. Van Dyke, L.E Kokai, B.J. Philips, J.P. Rubin and K.G. Marra, ‘*Keratin gel filler for peripheral nerve repair in a rodent sciatic nerve injury model*’, *Plast Reconstr Surgery*, 2012 Jan, 129(1).
- [30] P.S. Hill, P.J. Apel, J. Barnwell, T. Smith, L.A. Koman, A. Atala and M. Van Dyke, ‘*Repair of peripheral nerve defects in rabbits using keratin hydrogel scaffolds*’, *Tissue Eng Part A*, 2011 Jun, 17(11-12)
- [31] B. Mahanta, S.A. Mary, A. Bhaduri, V.R. Giridev, ‘*Electrospun PVA. Keratin Nanofibrous Scaffold and its Application in Neural Repair*’, *Trends Biomater Artif Organs*, 2014, 28:188–196
- [32] K.Y. Lee and D.J. Mooney DJ, ‘*Alginate: properties and biomedical applications*’, *Prog Polym Sci*, 2012, 37:106–126.
- [33] K. Kataoka, Y. Suzuki, M., Kitada, T. Hashimoto, H. Chou, H. Bai, M. Ohta, S. Wu, K. Suzuki and C. Ide, ‘*Alginate Enhances Elongation of Early Regenerating Axons in Spinal Cord of Young Rats*’, *Tissue Eng*, 2004, 10:493–504
- [34] M. Dash, F. Chiellini, R.M. Ottenbrite and E. Chiellini, ‘*Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications*’, *Prog Polym Science*, 2011, 36:981–1014.
- [35] G. Li, Q. Xiao, R. McNaughton, L. Han, L. Zhang, Y. Wang and Y. Yang, ‘*Nanoengineered porous chitosan/CaTiO₃ hybrid scaffolds for accelerating Schwann cells growth in peripheral nerve regeneration*’, *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2017, 158.
- [36] S. Farzamfar, F. Esmailpour, M. Rahmati, A. Vaez, M. Mirzali, B. Garmabi, A. Shayannia, E. Ebrahimi, H. Vahedi and M. Salehi, ‘*Poly-lactic Acid/Gelatin Nanofiber (PLA/GTNF) Conduits Containing Platelet-Rich Plasma for Peripheral Nerve Regeneration*’, *Int J Health Stud*. 2017; 3:29–32.

- [37] V. Carriel, M. Alaminos, I. Garzón, A. Campos and M. Cornelissen, '*Tissue engineering of the peripheral nervous system*', *Expert Rev Neurother.* 2014; 14:301–318.
- [38] M.S. Kim, J.W. Kim and J.K. Hyun, '*Development of Schwann cell-seeded multichannel scaffolds for peripheral nerve regeneration*', *J Neurol Sci*, 2017, 381:612–613.
- [39] M. Mir, N. Ahmed, and A.U. Rehman, '*Recent applications of PLGA based nanostructures in drug delivery.*', *Colloids Surf B: Biointerfaces*, 2017, 159:217–231.
- [40] J. Zhu, '*Bioactive Modification of Poly(ethylene glycol) Hydrogels for Tissue Engineering*', *Biomaterials*, 2011, 31:4639–4656.
- [41] K.J. Lampe, R.G. Mooney, K.B. Bjugstad and M.J. Mahoney, '*Effect of macromer weight percent on neural cell growth in 2D and 3D nondegradable PEG hydrogel culture*', *J Biomed Mater Res part A.*, 2010, 94:1162–1171.
- [42] A.o. Koob, B.S. Duerstock, C.F. Babbs, Y.I. Sun, R.B. Borgens, '*Intravenous Polyethylene Glycol Inhibits the Loss of Cerebral Cells after Brain Injury*', *J Neurotrauma.* 2005, 22:1092–1111
- [43] A. Kondyurin, K. Tsoutas, Q.X. Latour, M.J. Higgins, S.E. Moulton, D.R. McKenzie and M.M. Bilek, '*Structural Analysis and Protein Functionalization of Electroconductive Polypyrrole Films Modified by Plasma Immersion Ion Implantation*', *ACS Biomater Sci Eng.*, 2017, 3:2247–2258.
- [44] B. Xu, T. Bai, A. Sinclair, W. Wang, Q. Wu, F. Gao, H. Jia, S. Jiang and W. Liu, '*Directed neural stem cell differentiation on polyaniline-coated high strength hydrogels*', *Mater Today Chem.*, 2016, 1:15–22.
- [45] S.U. Rahman, S. Bilal, A. Ul Haq Ali Shah, '*Synthesis and Characterization of Polyaniline-Chitosan Patches with Enhanced Stability in Physiological Condition*', *Polymers (Basel).* 2020 Nov;12(12):2870.
- [46] O. Akhavan, E. Ghaderi and S.A. Shirazian, '*Near infrared laser stimulation of human neural stem cells into neurons on graphene nanomesh semiconductors*', *Colloids Surf B: Biointerfaces.* 2015, 126:313–321
- [47] W. Lee and V. Parpura V, '*Carbon nanotubes as substrates/scaffolds for neural cell growth*', In: Sharma HS, editor. *Progress in Brain Research.* 2009. pp. 110–125.
- [48] A. Subramanian, U.M. Krishnan and S. Sethuraman, '*Fabrication, characterization and in vitro evaluation of aligned PLGA-PCL nanofibers for neural regeneration*', *Ann Biomed Eng.*, 2012 Oct, 40(10):2098-110.

- [49] A. Subramanian, U.M. Krishnan and S. Sethuraman ‘*Development of biomaterial scaffold for nerve tissue engineering: Biomaterial mediated neural regeneration*’, J Biomed Sci, 2009 Nov;16(1):108.
- [50] S. Shaochen, W. Xuejie, W. Tiejun, Y. Qinghua, H. Zheyu, Z. Zhe and L. Rui, ‘*Additive Manufacturing of Nerve Guidance Conduits for Regeneration of Injured Peripheral Nerves*’, Front Bioeng Biotechnol. (2020); 8: 590596.
- [51] J.R. Kim, S.H. Oh, G.B Kwon, ‘*Acceleration of peripheral nerve regeneration through asymmetrically porous nerve guide conduit applied with biological/physical stimulation*’, Tissue engineering. Part A. 2013 Dec;19(23-24).
- [52] T. Gros, J.S. Sakamoto, A. Blesch, L.A. Havton and M.H. Tuszynski, ‘*Regeneration of long-tract axons through sites of spinal cord injury using templated agarose scaffolds*’, Biomaterials, 2010, 31 (26), 6719-6729.
- [53] L. Papadimitriou, P. Manganas, A. Ranella and E. Stratakis, ‘*Biofabrication for neural tissue engineering applications*’, Mater Today Bio., 2020 Jan
- [54] T.J. Sill, H.A. Von Recum, ‘*Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering*’, Biomaterials, 2008, 1989-2006
- [55] P.J. Apel, J.P. Garrett, P. Sierpinski, J. Ma, A. Atala, T.L. Smith, L.A. Koman, M.E. Van Dyke, ‘*Peripheral nerve regeneration using a keratin-based scaffold: long-term functional and histological outcomes in a mouse model*’, J Hand Surg Am. 2008 Nov;33(9):1541-7.
- [56] P. Sierpinski, J. Garrett, J. Ma, P. Apel, D. Kloring, T. Smith, L.A. Koman, A. Atala and M. Van Dyke, ‘*The use of keratin biomaterials derived from human hair for the promotion of rapid regeneration of peripheral nerves*’, Biomaterials. 2008; 29:118–128.
- [57] Q. Gu, E. Tomaskovic-Crook, R. Lazano, Y. Chen, R.M. Kapsa, Q. Zhou Q, ‘*Functional 3D neural mini-tissues from printed gel-based bioink and human neural stem cells*’, Adv Healthc Mater. 2016; 5:1429–1438.
- [58] V. Guarino, S. Zuppolini, A. Borriello and L. Ambrosio ‘*Electro-Active Polymers (EAPs): A Promising Route to Design Bio-Organic/Bioinspired Platforms with on Demand Functionalities*’, Polymers. 2016; 8(5):185
- [59] T.Y Yuan, J. Zhang, T. Yu, J.P. Wu, Q.Y. Liu, ‘*3D Bioprinting for Spinal Cord Injury Repair. Front Bioeng Biotechnol*’, 2022 Apr 20;10:847344.

- [60] T. Bedir, S. Ulag, C.B. Ustundag, O. Gunduz, '3D bioprinting applications in neural tissue engineering for spinal cord injury repair', *Materials Science and Engineering: C*, 2020,
- [61] X. Yu, T. Zhang, Y. Li, '3D Stampa e bioprinting condotti nervosi per l'ingegneria del tessuto neurale', *Polimeri (Basilea)*. 2020 Jul;12(8):1637.
- [62] Y.J. Seol, H.W. Kang, S.J. Sottovento, 'La tecnologia di bioprinting e le sue applicazioni', *Eur. J. Cardiothorac. Surg.*, 46 (2014), pp. 342-348,
- [63] C.M. O'Brien, B. Holmes, S. Faucett, L.G. Zhang., 'Stampa tridimensionale di scaffold di nanomateriali per la rigenerazione di tessuti complessi'. *Tissue Eng Part B Rev.* 2015 Feb;21(1):103-14.
- [64] The White House and Office of the Press Secretary, 'FACT SHEET: President Obama's Precision Medicine Initiative'. Jan. 30, 2015. [Online]. Available: <https://obamawhitehouse.archives.gov/the-press-office/2015/01/30/fact-sheet-president-obama-s-precision-medicine-initiative>