



Università degli Studi di Padova

Facoltà di Ingegneria

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica

tesi di laurea

**MATRICI ELETTROFILATE DI PEPTIDI
AUTO-ASSEMBLANTI PER L'INGEGNERIA DEL
TESSUTO OSSEO**

Relatore: Dott.ssa Monica Dettin
Correlatore: Dott.ssa Paola Brun

Laureanda: Elena Bozza

26 ottobre 2010

Sommario

L'Ingegneria tessutale richiede la costruzione di biomateriali in grado di riprodurre le caratteristiche della matrice extracellulare.

Electrospinning e peptidi auto-assemblanti sono due tra le tecniche attualmente utilizzate a questo scopo. Il loro impiego riguarda l'immobilizzazione di enzimi e catalizzatori, la medicazione di ferite, il rilascio controllato di farmaci e, soprattutto, la crescita di tessuti artificiali.

In questo lavoro si propone un nuovo tipo di *scaffold* per la produzione di tessuto osseo ingegnerizzato. I supporti elettrofilati sono costruiti a partire da una soluzione di polimero sintetico e di peptide auto-assemblante. L'operazione ha lo scopo di combinare le proprietà meccaniche e funzionali del polimero con le proprietà biologiche e di *signaling* molecolare del peptide, migliorando l'adesione e lo *spreading* cellulari. La regolazione dei parametri di *electrospinning* serve a modulare le caratteristiche del polimero (PCL), l'utilizzo di peptidi diversi (EAK, DAK, EAbuK, EYK, RGD-EAK, RGD-EAK sc) a variare le caratteristiche biochimiche del supporto. Il lavoro sperimentale si svolge in più fasi. Dapprima si valutano morfologia e struttura chimica della fibra con indagini al SEM e spettri IR. Infine, si effettuano gli studi biologici su colture di osteoblasti, misurando l'adesione cellulare, la concentrazione di calcio e il livello di espressione genica. I risultati ottenuti dimostrano che l'incorporazione di peptidi che auto-assemblano all'interno del polimero ha l'effetto di stimolare l'adesione da parte delle cellule, rispetto all'utilizzo del solo PCL. I risultati sono particolarmente promettenti per lo *scaffold* in PCL/RGD-EAK, che contiene una sequenza, l'RGD appunto, presente in molte proteine della matrice extracellulare nativa.

In conclusione, l'*electrospinning* congiunto di polimero sintetico e di peptidi auto-assemblanti fornisce uno *scaffold* adatto alla crescita degli osteoblasti, che, quindi, può essere considerato nella messa a punto di matrici innovative per la medicina rigenerativa.

L'outline della tesi è il seguente.

Il *Capitolo 1* descrive, brevemente, la struttura e i principali componenti

del tessuto osseo, l'*electrospinning* (apparato, fenomenologia e parametri di processo), i peptidi auto-assemblanti (sequenza, proprietà e variabili di modificazione) e illustra le applicazioni di questi metodi all'Ingegneria del tessuto osseo, attualmente presenti in letteratura, chiarendo scopi e contesto del presente lavoro di tesi.

Il *Capitolo 2* descrive i principali metodi utilizzati per le attività di laboratorio: apparato e principi di funzionamento della strumentazione, teoria e fasi di esecuzione dei saggi cellulari.

Il *Capitolo 3* riporta l'attività sperimentale, i principali risultati ottenuti e la discussione degli stessi.

Indice

Sommario	III
1 Introduzione	1
1.1 Istologia del Tessuto Osseo	1
1.1.1 Struttura della matrice extracellulare ossea	2
1.1.2 Cellule del tessuto osseo	4
1.2 Electrospinning: Protocollo e Teoria	6
1.2.1 Set-up sperimentale	7
1.2.2 Parametri	9
1.3 I Peptidi Auto-Assemblanti	9
1.3.1 Definizione	10
1.3.2 Parametri di progetto	11
1.4 Ingegneria del Tessuto Osseo: Stato dell'Arte	11
1.4.1 Scaffold elettrofilati	12
1.4.2 Scaffold di peptidi auto-assemblanti	17
1.5 Scopo della Tesi	19
2 Metodi	21
2.1 Sintesi e Purificazione dei Peptidi Auto-Assemblanti	21
2.2 Microscopia a Scansione Elettronica	22
2.3 Spettroscopia Infrarossa in Trasformata di Fourier	25
2.4 Calorimetria a Scansione Differenziale	27
2.5 Angolo di Contatto	29
2.6 Test MTT	30
2.7 Metodo o-CPC	31
2.8 Analisi rt-PCR dell'Espressione Genica	31
3 Parte Sperimentale	33
3.1 Materiali e Metodi	33
3.1.1 Preparazione dei peptidi auto-assemblanti	33
3.1.2 Preparazione delle soluzioni	33

3.1.3	Electrospinning	34
3.1.4	Trattamento con tampone salino	35
3.1.5	Analisi al microscopio elettronico	35
3.1.6	Analisi spettroscopica infrarossa	35
3.1.7	Analisi calorimetrica	36
3.1.8	Misura dell'angolo di contatto	36
3.1.9	Coltura cellulare	36
3.1.10	Semina delle cellule	37
3.1.11	Saggio MTT	37
3.1.12	Determinazione dei livelli di calcio	38
3.1.13	Espressione di proteine caratteristiche degli osteoblasti	38
3.2	Risultati e discussione	39
3.2.1	Morfologia degli scaffold elettrofilati	39
3.2.2	Spettroscopia infrarossa	41
3.2.3	Calorimetria	43
3.2.4	Bagnabilità	46
3.2.5	Saggio MTT	49
3.2.6	Livelli di calcio	51
3.2.7	Espressione di ALP, osteopontina e IBS	52
4	Conclusioni	55
	Bibliografia	57
	Elenco delle tabelle	62
	Elenco delle figure	64

Capitolo 1

Introduzione

Un approccio comune in Ingegneria tessutale è quello di riprodurre l'architettura della matrice extracellulare naturale. Essa è composta, principalmente, da polisaccaridi e proteine e ha l'aspetto di un intreccio fibroso. La matrice extracellulare svolge un ruolo fondamentale nella regolazione del comportamento delle cellule. Queste ultime, infatti, sono ancoraggio-dipendenti e la mancata adesione ad un supporto ne causa la morte: ecco perché si rende necessaria la costruzione di matrici tridimensionali. Queste devono fornire un ambiente estremamente favorevole non solo all'adesione, ma anche alla migrazione, alla proliferazione e alla differenziazione cellulari. Di conseguenza, come potenziali *scaffold* per l'Ingegneria tessutale sono stati proposti costrutti nanofibrosi. Le nanofibre esibiscono un rapporto superficie-volume estremamente grande e tale proprietà facilita il rilascio di fattori biochimici (proteine, farmaci, acidi nucleici), incrementa l'area di contatto tra fibre e cellule e, in questo modo, anche il *network* di interazioni chimiche cellula-cellula.

Molti approcci sono stati sviluppati per produrre nanofibre. In questo capitolo, dopo una breve descrizione delle caratteristiche principali del tessuto osseo, vengono riportati due metodi di fabbricazione largamente studiati: l'elettrofilatura e l'auto-aggregazione. Infine, si ripercorrono i lavori più recenti che la letteratura propone in materia.

1.1 Istologia del Tessuto Osseo

L'osso è un tessuto connettivo complesso, molto organizzato e specializzato. Rispetto ai tessuti molli, è duro, rigido, resistente.

Nel seguito si descrivono, in breve, le caratteristiche principali della matrice extracellulare (extracellular matrix, ECM) ossea e le cellule proprie

di questo tessuto. Per ulteriori approfondimenti in materia, si rimanda al riferimento [1].

1.1.1 Struttura della matrice extracellulare ossea

La ECM dell'osso è formata da fibre connettivali e da sostanza amorfa. Al materiale organico si aggiunge, inoltre, una componente minerale.

Le fibre connettivali sono rappresentate, per la quasi totalità, da collagene di tipo I. Il collagene dell'osso possiede molti legami incrociati, che tengono unite le singole unità di tropocollagene.

La sostanza fondamentale amorfa ha una composizione peculiare e, in buona misura, diversa da quella degli altri tessuti connettivi. Di essa fanno parte varie classi di macromolecole: proteoglicani, glicoproteine, sialoproteine e proteine contenenti acido γ -carbossigluttammico.

I proteoglicani (proteoglicans, PGs) sono composti da glicosamminoglicani acidi, solitamente solforati. Tra i meglio conosciuti, si annoverano il proteoglicano di tipo I (PG-I) e il proteoglicano di tipo II (PG-II). Si ipotizza che il PG-II, in particolare, abbia un ruolo nell'orientare la deposizione dei cristalli minerali lungo le microfibrille di collagene.

Le glicoproteine sono, di solito, fosforilate o solfatate. Esse includono diverse molecole, alcune delle quali sono coinvolte nel controllo dei processi di mineralizzazione. Tra queste, particolarmente importanti sono:

- l'osteonettina. Tra le proteine del tessuto osseo è la più abbondante. L'osteonettina è dotata di alta affinità per il calcio, sia che si tratti dello ione libero, sia che si trovi associato in complessi di tipo cristallino. Si ritiene che agisca come elemento di nucleazione dei cristalli minerali e che dia luogo, in questo modo, all'avvio della precipitazione del fosfato di calcio;
- la fosfatasi alcalina (alkaline phosphatase protein, ALP). È un enzima capace di idrolizzare i gruppi fosfato legati a substrati organici e risulta attivo in ambiente alcalino. Si pensa che abbia un ruolo attivo nei processi di mineralizzazione, mettendo a disposizione ioni fosfato per la formazione di cristalli minerali e che sia coinvolta nella sintesi di matrice organica dell'osso. Proprio per il ruolo attivo di questa proteina nella mineralizzazione, il gene correlato alla sua espressione (alkaline phosphatase, liver/bone/kidney, ALPL) viene spesso utilizzato come indicatore della produzione di matrice ossea.
- la fibronettina. Questa macromolecola di adesione, localizzata prevalentemente nella matrice pericellulare, è caratterizzata da una por-

zione capace di legarsi al collagene. Si ritiene che la fibronettina sia coinvolta nei processi di migrazione, di adesione alla matrice e di organizzazione delle cellule ossee.

Le sialoproteine ossee (bone sialo-proteins, BSPs) sono glicoproteine contenenti residui glicosidici di acido sialico. Queste proteine contengono la sequenza amminoacidica Arg-Gly-Asp (RGD), che media l'adesione al substrato di svariati tipi di cellule, incluse quelle dell'osso. Si ritiene, pertanto, che le sialoproteine ossee abbiano la funzione di consentire l'adesione delle cellule alla matrice ossea. Se ne conoscono di più tipi: l'osteopontina (BSP-I), la BSP-II e la glicoproteina acida dell'osso. Anche in questo caso, il monitoraggio dei geni associati all'espressione delle sialoproteine fornisce informazioni importanti sulla mineralizzazione della matrice e sui livelli di interazione cellule-matrice: si tratta dei geni SPP1 (secreted phosphoprotein 1) e IBSP (integrin-binding sialoprotein), che valutano la presenza di BSP-I e BSP-II.

Le proteine dell'osso contenenti acido γ -carbossigluttammico (gamma linolenic acid, GLA) sono di due tipi: osteocalcina (o proteina GLA dell'osso) e proteina GLA della matrice. L'osteocalcina è una piccola proteina. È stato ipotizzato che possa inibire la mineralizzazione: è capace, infatti, di legare lo ione calcio e di renderlo indisponibile per la combinazione con lo ione fosfato, inibendo così l'accrescimento dimensionale dei cristalli minerali. L'ipotesi è avvalorata dal fatto che l'osteocalcina abbonda nel tessuto osseo maturo ed è scarsa nel tessuto osseo in via di formazione. La proteina GLA della matrice è presente, invece, sia nell'osso maturo che in quello in via di formazione. Il suo ruolo biologico, tuttavia, non è ancora chiaro.

La componente minerale è rappresentata da cristalli di sali di calcio: prevalentemente fosfato di calcio, ma anche carbonato di calcio e tracce di altri sali, tra cui il fluoruro di calcio e il fosfato di magnesio. Il fosfato di calcio è presente sotto forma di cristalli di apatite: per la maggior parte idrossiapatite, ma sono anche presenti carbonatoapatite e fluoroapatite. I cristalli di apatite tendono a disporsi parallelamente alle microfibrille di collagene, di cui ricoprono la superficie e permeano le porosità. La deposizione di nuovo minerale può avvenire sia per formazione di nuovi cristalli, che per apposizione su cristalli preesistenti. Tale fenomeno è finemente regolato dalle cellule ossee tramite la produzione di specifiche molecole della matrice.

1.1.2 Cellule del tessuto osseo

Si possono distinguere quattro tipi di cellule nell'osso: le osteoprogenitrici (dette anche preosteoblasti), gli osteoblasti, gli osteociti e gli osteoclasti. Tra queste, le cellule osteoprogenitrici, gli osteoblasti e gli osteociti sono, in realtà, fasi funzionali consecutive dello stesso tipo cellulare, a sua volta derivato dalla differenziazione, in senso osteogenico, della cellula mesenchimale pluripotente dei tessuti connettivi; sono, pertanto, cellule autoctone dell'osso. Gli osteoclasti, per contro, derivano da precursori migrati nel tessuto osseo dal sangue, i cosiddetti preosteoclasti, i quali, a loro volta, si differenziano a partire da cellule staminali del midollo osseo ematopoietico.

Le cellule osteoprogenitrici, o preosteoblasti, si collocano sulle superfici libere delle ossa e hanno capacità proliferativa. Esse sono in grado di produrre e di secernere proteine morfogenetiche dell'osso (bone morphogenetic proteins, BMPs), fattori di crescita e di differenziamento autocrini. Quando imboccano la via del differenziamento, le cellule osteoprogenitrici si trasformano in osteoblasti.

Gli osteoblasti sono responsabili della sintesi di sostanza intercellulare dell'osso e della sua mineralizzazione. Sono uniti tra di loro e con gli osteociti prossimali attraverso *gap junctions*. Quest'ultime rappresentano le interconnessioni tramite cui avviene la coordinazione dell'attività metabolica e di deposizione di matrice.

Alla regolazione della mineralizzazione, contribuiscono alcune molecole prodotte dagli osteoblasti, tra cui l'osteonettina e l'osteocalcina. La prima favorisce la nucleazione dei cristalli minerali, mentre la seconda agisce da inibitore della precipitazione del fosfato di calcio. La produzione di matrice ossea e la sua mineralizzazione avvengono secondo un ordine ben preciso: inizialmente, l'osteoblasto depone osso dal lato rivolto verso la superficie ossea preesistente; successivamente, ne depone in ogni direzione intorno a se stesso. In questo modo, ciascuna cellula si allontana progressivamente dalle altre a causa dell'interposizione di matrice. A questo punto, l'osteoblasto rallenta l'attività metabolica e si trasforma in osteocita, mentre nuovi osteoblasti si differenziano dalle cellule osteoprogenitrici. Quando il processo di formazione di nuovo tessuto si è esaurito, gli osteoblasti che rimangono a ridosso della superficie ossea cessano l'attività, riducono gli organuli e si trasformano in una membrana di cellule appiattite. Si tratta delle cosiddette cellule di rivestimento dell'osso, a cui si attribuisce il ruolo di mediatori negli scambi tra vasi sanguigni e osteociti.

Gli osteoblasti producono e secernono anche diversi fattori solubili, tra cui il fattore di crescita trasformante β (transforming growth factor β , TGF- β) e i fattori di crescita insulino-simili (insulin-like growth factors, IGFs).

Il TGF- β è un potente stimolatore degli osteoblasti stessi; è capace di modulare la proliferazione delle cellule osteoprogenitrici, di promuovere il loro differenziamento e di incrementare il metabolismo e la sintesi macromolecolare degli osteoblasti maturi. Gli IGFs sono, invece, molecole proteiche strettamente imparentate tra loro e con una spiccata azione di stimolo sulla crescita e sul metabolismo osteoblastico.

Gli osteoblasti sono coinvolti nel rimodellamento dell'osso. Infatti, sono in grado di innescare il riassorbimento della matrice ossea sia indirettamente, producendo fattori solubili che attivano gli osteoclasti, sia direttamente, con la secrezione di enzimi proteolitici, che scindono i componenti della matrice organica dell'osso. Tra questi enzimi vi è la collagenasi, che rimuove lo strato di tessuto osteoide non mineralizzato sulla superficie dell'osso e consente agli osteoclasti di aderire alla matrice e dissolverla.

Gli osteociti sono cellule tipiche dell'osso maturo, responsabili del suo mantenimento e capaci di avviarne il rimodellamento. Il corpo dell'osteocita rimane racchiuso all'interno di una nicchia scavata nella sostanza intercellulare, detta lacuna ossea, la cui forma ricalca quella della cellula, mentre i prolungamenti sono accolti in sottili canalicoli ossei. Alle loro estremità, questi prolungamenti sono connessi, mediante *gap junctions*, con quelli degli osteociti circostanti. Ciò permette lo scambio di metaboliti e molecole-segnaletica tra osteociti vicini. Tra la membrana plasmatica del corpo cellulare e dei prolungamenti e la matrice mineralizzata rimane uno spazio sottile occupato da tessuto osteoide che non mineralizza. Attraverso il tessuto osteoide delle lacune e dei canalicoli ossei, l'acqua e le sostanze disciolte (gas respiratori e metaboliti) riescono a raggiungere tutti gli osteociti, anche quelli più distanti dai vasi sanguigni. Quando l'osteocita termina il suo ciclo vitale, ritrae i prolungamenti e degenera.

Gli osteoclasti sono cellule preposte al riassorbimento osseo. Come già accennato, non appartengono alla linea che deriva dalle cellule osteoprogenitrici. I precursori degli osteoclasti, detti preosteoclasti, originano nel midollo osseo ematopoietico e sono imparentati con la linea differenziativa di una categoria di globuli bianchi, i monociti. I preosteoclasti vengono trasportati dal torrente circolatorio fino alle sedi di riassorbimento osseo; qui giunti, migrano nel tessuto e si fondono insieme originando gli osteoclasti attivi, elementi sinciziali capaci di dissolvere la componente minerale e di digerire enzimaticamente le componenti organiche della matrice.

Il riassorbimento della matrice inizia con la dissoluzione della componente minerale. L'azione erosiva dell'osteoclasto si manifesta con la formazione di una lacuna. La funzione osteoclastica è finemente regolata da fattori ormonali e locali. In particolare, gli osteoclasti sono le uniche cellu-

le dell'osso a possedere recettori per l'ormone calcitonina. La calcitonina è un inibitore del riassorbimento osseo: induce il distacco degli osteoclasti dall'osso e ne riduce il metabolismo cellulare.

1.2 Electrospinning: Protocollo e Teoria

Scoperta e brevettata negli anni '30, la filatura elettrostatica (chiamata in seguito elettrofilatura o *electrospinning*) non è una tecnologia nuova per la produzione di polimeri fibrosi.

Lo scarso successo iniziale è riconducibile ad alcuni impedimenti oggi superati: resa limitata del processo, proprietà meccaniche non soddisfacenti delle strutture ottenute, distribuzione molto varia dei diametri delle fibre prodotte; questi fattori hanno impedito all'elettrofilatura un importante sviluppo industriale, a vantaggio delle tecniche convenzionali. Nonostante ciò, negli ultimi anni, speciali richieste per applicazioni innovative in svariati campi (dal militare al biomedico) hanno stimolato nuovi studi e rinnovato l'interesse per questo processo, dando vita ad una consistente

Anno	Persone	Descrizione
1934-44	A. Formhals	U.S. pat. #s 1,975,504 2,077,373 2,109,333 2,116,942 2,123,992 2,158,415 2,158,416 2,160,962 2,187,306 2,323,025 2,349,950
1929	K. Hagiwara	U.S. pat. # 1,699,615
1936	C.L. Norton	U.S. pat. # 2,048,651
1939	E.K. Gladding	U.S. pat. # 2,168,027
1943	F.W. Manning	U.S. pat. # 2,336,745
1966	H.L. Simons	U.S. pat. # 3,280,229
1976	W. Simm et al.	U.S. pat. # 3,944,258
1977-78	G.E. Martin et al.	U.S. pat. # 4,043,331 4,044,404 4,127,706
1978	W. Simm et al.	U.S. pat. # 4,069,026
1980	J. Fine et al.	U.S. pat. # 4,223,101
1980-81	C. Guignard	U.S. pat. # 4,230,650; 4,287,139
1982	A. Bornat	U.S. pat. # 4,323,525
1985	T.V. How	U.S. pat. # 4,552,707
1987	A. Bornat	U.S. pat. # 4,689,186
1989	G.E. Martin et al.	U.S. pat. # 4,878,908
1991	J.P. Berry	U.S. pat. # 5,024,789
2000	F.L. Scardino, R.J. Balonis	U.S. pat. # 6,106,913
2004	B. Chu et al.	U.S. pat. # 6,713,011

Tabella 1.1. Sviluppo cronologico dei brevetti sull'*electrospinning*.

ripresa delle attività di ricerca. La tabella 1.1 riporta i brevetti depositati fino ad oggi.

L'*electrospinning* è, tuttora, l'unica metodica in grado di fornire polimeri fibrosi ultrafini, con diametri di pochi nanometri e di abbattere i limiti raggiunti con i metodi convenzionali.

1.2.1 Set-up sperimentale

Una tipica apparecchiatura per *electrospinning* è costituita principalmente da quattro elementi (figura 1.1):

- una siringa, che contiene la soluzione polimerica da elettrofilare;
- una pompa volumetrica, che dosa il fluido in uscita dalla siringa;
- un generatore di tensione ad alto potenziale, collegato all'ago della siringa per mezzo di un elettrodo;
- un collettore metallico, messo a terra, che ha la funzione di raccogliere le fibre.

Il processo prevede l'applicazione di un forte campo elettrico sul fluido polimerico (in soluzione o fuso). La tensione impartita (10-40 kV) genera una forza elettrostatica che prevale ampiamente sulla tensione superficiale e gli sforzi viscosi della massa polimerica, formando un vero e proprio getto che si proietta in direzione dell'elettrodo opposto. Il fluido è caricato positivamente ed è alimentato attraverso la siringa dosatrice, regolata dalla pompa volumetrica. Si viene così a creare un getto di soluzione dall'orifizio alimentatore fino ad un apposito dispositivo di raccolta (collettore), situato in prossimità del catodo. Il getto elettricamente carico, che emerge dalla base del foro, sviluppa una geometria conica (cono di Taylor) e, attraversando il campo elettrico, viene accelerato e assottigliato a formare un filamento stirato, grazie anche all'evaporazione del solvente. Il cono di Taylor nasce nel getto quando il trasporto idraulico, impartito al fluido dallo stantuffo della siringa, è superato da quello elettrostatico dovuto al forte campo elettrico presente tra gli elettrodi.

In determinate condizioni operative, il getto fluido diventa instabile prima di raggiungere il raccogliatore; con fluidi a basso peso molecolare questa instabilità produce uno *spray* di piccole gocce cariche di elettricità statica: è il caso dell'*electrospraying*. Utilizzando, invece, polimeri fluidi (in soluzione o fusi), le forze viscoelastiche stabilizzano il getto, permettendo la formazione di filamenti carichi finissimi, che appaiono come un cono di

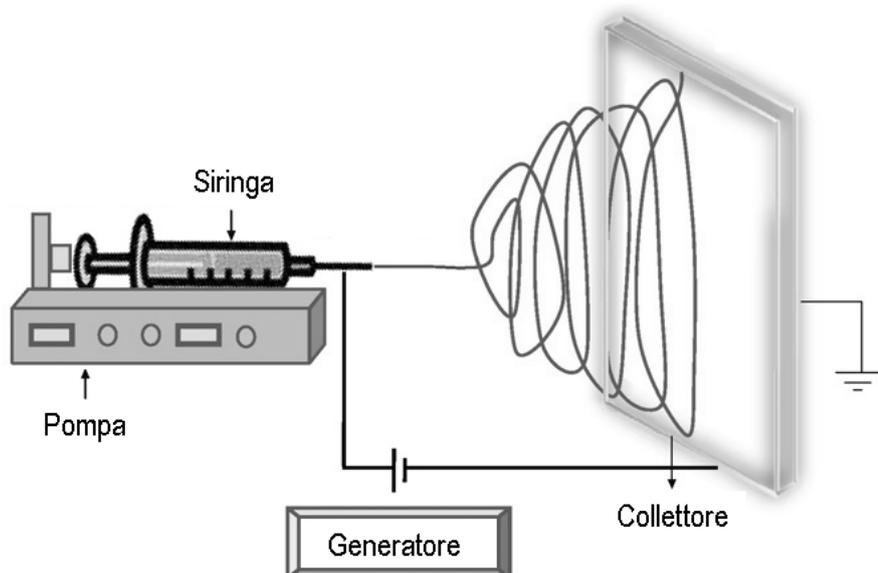


Figura 1.1. Disegno schematico dell'apparato di *electrospinning*: set-up orizzontale.

fluidi dispersi e, una volta depositati sul raccogliatore, formano un tessuto non-tessuto. In queste condizioni, si osservano diametri nell'ordine di $0.1 \mu\text{m}$: tre ordini di grandezza al di sotto del diametro del getto che entra nella regione di instabilità ($100 \mu\text{m}$) e ampiamente inferiori al diametro delle fibre estruse con forze meccaniche. Con un'osservazione accurata e il supporto della fotografia ad alta velocità, è stato individuato il motivo per cui si verifica questa drastica riduzione: la causa principale è una rapida rotazione a spirale del getto accelerato. A questo processo è stato attribuito il nome di *whipping motion* (movimento di "frusta").

Le fibre ottenute vengono raccolte su uno schermo scaricato elettricamente a terra, solitamente di materiale metallico. Il collettore può essere un piano statico, con la funzione, quindi, di raccogliere una stuovia di fibre disordinate, o di geometria cilindrica (mandrino), messo in rotazione da appositi dispositivi, per una raccolta del filo più ordinata. Se il fluido, sia esso un polimero fuso o in soluzione, è alimentato costantemente, si possono fabbricare nanofibre continue.

Con l'*electrospinning* è possibile filare una vasta gamma di polimeri tra cui poliammidi, polimeri polifunzionali, derivati della cellulosa, poli-

meri solubili in acqua, miscele polimeriche, polimeri contenenti nanoparticelle solide o piccole molecole funzionali. L'elettrofilatura è un processo estremamente versatile.

1.2.2 Parametri

La semplicità operativa della strumentazione per l'elettrofilatura si scontra con la difficile messa a punto delle variabili sperimentali.

Il processo di *electrospinning* è influenzato, infatti, da numerosi parametri, strettamente correlati tra loro. Per questo motivo, ogni polimero necessita di un'ottimizzazione individuale.

La morfologia delle nanofibre, in termini di valore medio e distribuzione dei diametri delle fibre e presenza o meno di difetti, dipende da due serie di parametri principali:

- parametri della soluzione polimerica. Tra questi è necessario considerare il peso molecolare del polimero e la sua distribuzione, le proprietà del sistema solvente (tensione di vapore, conducibilità, costante dielettrica), la concentrazione della soluzione e, di conseguenza, la sua viscosità;
- parametri specifici del processo. Questi comprendono il potenziale elettrico, la velocità di flusso della soluzione (portata del fluido), la distanza tra il capillare e il collettore, il tipo di collettore (statico, dinamico, conduttore, isolante), il diametro interno dell'ago della siringa, le condizioni ambientali (temperatura e umidità).

In genere, si può agire sui parametri della soluzione per controllare la morfologia dei nanofilamenti ed evitare la formazione di gocce (il difetto più frequente nell'*electrospinning*). Per un dato sistema polimero-solvente, infatti, un aumento della viscosità e/o della densità di carica o una riduzione della tensione superficiale favoriscono la formazione di fibre più lisce ed omogenee.

1.3 I Peptidi Auto-Assemblanti

L'auto-aggregazione molecolare è ubiquitaria in natura e permette la formazione di macromolecole come il DNA a doppia elica, i ribosomi, il collagene, la fibroina della seta, le membrane plasmatiche.

Nonostante sia un fenomeno largamente conosciuto, solo recentemente è stato utilizzato nella fabbricazione di *scaffold* per l'Ingegneria tessutale.

Ciò è avvenuto con la scoperta negli anni '90, ad opera di Zhang *et al.*, di una classe particolare di molecole auto-assemblanti: i peptidi ionico complementari [2].

L'interesse per questi peptidi è cresciuto, soprattutto nell'ultimo decennio, grazie alla loro abilità nel formare strutture 2D e 3D.

1.3.1 Definizione

L'auto-assemblamento è la spontanea organizzazione di molecole in strutture ben definite e stabili, in condizioni di equilibrio termodinamico. Il fenomeno avviene grazie ad interazioni non covalenti, come i legami a idrogeno e le forze di van der Waals.

I peptidi auto-assemblanti sintetici possono essere derivati da proteine naturali oppure sintetizzati *ad hoc*. Si tratta, in ogni caso, di peptidi anfifilici, cioè formati da una regione idrofila e da una idrofobica, capaci di aggregare in soluzione acquosa. L'auto-assemblamento è correlato sia alla natura intrinseca dei singoli amminoacidi, sia alla loro posizione nella sequenza. È, quindi, possibile ottenere una determinata struttura secondaria scegliendo e predisponendo opportunamente gli amminoacidi.

I peptidi per auto-aggregare devono possedere due caratteristiche: la complementarità (ossia la ripetizione di una particolare distribuzione di carica all'interno della sequenza) e la compatibilità strutturale. I peptidi ionico complementari rispondono ad entrambe le esigenze. Sono, infatti, caratterizzati dall'alternanza di residui positivi e negativi. Da questa sequenza ordinata di cariche, derivano particolari interazioni elettrostatiche, che i peptidi utilizzano, insieme ai legami a idrogeno e alle forze di van der Waals, per guidare l'auto-aggregazione molecolare (figura 1.2).

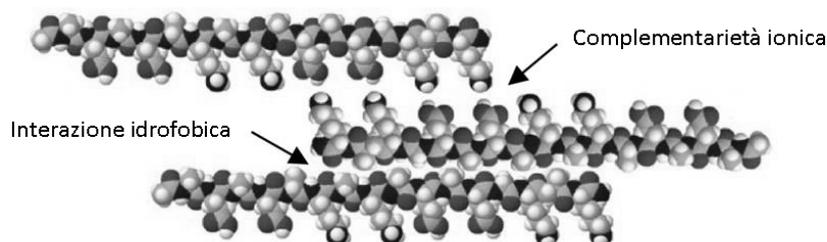


Figura 1.2. Schema di aggregazione mediata dall'interazione idrofobica e dalla complementarità ionica del peptide EAK16-II.

Zhang ha classificato questi peptidi in cinque tipi, in funzione della struttura e dell'applicazione finale: tipo I ("molecular Lego"), tipo II ("molecular switch"), tipo III ("molecular hook" e "molecular velcro"), tipo IV ("molecular capsule"), tipo V ("molecular cavity"). In base al *pattern* delle cariche, possono essere ulteriormente suddivisi in moduli: modulo I (-+), modulo II (--++), modulo III (---+++), modulo IV (----++++), e moduli misti.

Nel seguito si fa riferimento ai peptidi di tipo I, in quanto specifici per la formazione di *scaffold*. Per una trattazione più generale si rimanda al riferimento bibliografico [3].

I peptidi di tipo I formano strutture β -sheet in soluzione acquosa. Sono chiamati "molecular Lego" perché, come i mattoncini Lego, possono interagire tra loro solo in certe combinazioni. La caratteristica principale di questi peptidi è la formazione di legami ionico complementari con ripetizioni regolari sulla superficie idrofilica.

1.3.2 Parametri di progetto

Le caratteristiche sulle quali è possibile agire in fase di progetto degli oligopeptidi sono:

- la distribuzione di carica. Questa può essere resa negativa, positiva o irregolare; tuttavia, soltanto l'alternanza delle cariche sembra formare macrostrutture in soluzione;
- il tipo di amminoacidi. I peptidi possono essere sintetizzati sia *de novo*, sia sostituendo uno o più amminoacidi all'interno di una sequenza nota;
- la lunghezza della catena. Si possono sintetizzare sequenze da 8 a 32 amminoacidi.

La formazione di strutture microscopiche e macroscopiche, di geometria variabile, è, inoltre, stimolata dal contatto dei peptidi con soluzioni fisiologiche, saline o contenenti cationi alcalini monovalenti.

1.4 Ingegneria del Tessuto Osseo: Stato dell'Arte

Obiettivo dell'Ingegneria del tessuto osseo è sviluppare *scaffold* tridimensionali per la riparazione di difetti ossei. Lo *scaffold* è, essenzialmente, un

surrogato o un sostituto sintetico della matrice extracellulare dell'osso e, in quanto tale, deve fornire un ambiente adatto all'adesione e alla proliferazione cellulari, oltre a possedere le proprietà meccaniche del tessuto naturale, una volta che sia stato ripopolato di cellule.

Nel seguito, si riportano gli studi finora compiuti in materia, con riferimento all'*electrospinning* e alle strutture di peptidi auto-assemblanti.

1.4.1 Scaffold elettrofilati

Le matrici elettrofilate possono essere classificate, secondo la composizione, in tre categorie: polimeri degradabili (sintetici, naturali e biosintetici), materiali inorganici bioattivi e forme composite.

I polimeri sono stati i primi materiali ad essere utilizzati per la produzione di matrici elettrofilate, in quanto presentano numerosi vantaggi: composizione chimica uniforme, facilità di progettazione e di customizzazione delle proprietà meccaniche e chimiche, disponibilità commerciale. Le matrici elettrofilate di polimeri sintetici permettono di stimolare le cellule del *pathway* osteogenico con istanze di differenziazione ben controllate. Tuttavia, siccome molti dei polimeri sintetici non sono biodegradabili, la scelta è, in qualche modo, ristretta. La maggior parte dei lavori in letteratura si basa, sostanzialmente, sui tre polimeri poli- ϵ -caprolattone (PCL) (figura 1.3), acido polilattico (PLA), acido poliglicolico (PGA) e sui loro copolimeri. Le proprietà termiche e meccaniche principali di questi polimeri sono riportate in tabella 1.2.

I primi lavori verificano, per lo più, l'ipotesi di stretta dipendenza tra struttura fibrosa dello *scaffold* e crescita cellulare. In [4], Yoshimoto *et al.* utilizzano uno *scaffold* elettrofilato in PCL ed uno in copolimero polilattico-glicolico (PLGA), ottenuto con un'altra tecnica di fabbricazione. A 4

Polimero	T_m (°C)	T_g (°C)	Modulo (MPa)	Degradazione ^a (mesi)
PGA	225-230	35-40	7	6-12
PLLA	173-178	60-65	2.7	>24
PDLLA	amorfo	55-60	1.9	12-16
PCL	58-63	-(65-60)	0.4	>24

^a La velocità di degradazione *in vivo* dipende anche dal peso molecolare del polimero e dal diametro delle fibre elettrofilate.

Tabella 1.2. Proprietà termiche e meccaniche dei polimeri biodegradabili più comunemente utilizzati in applicazioni biomediche.

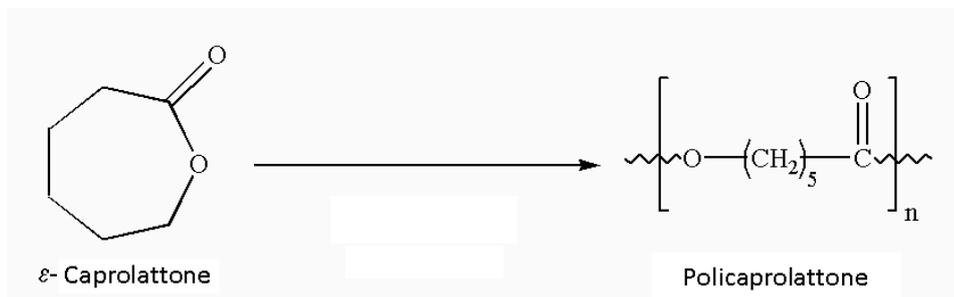


Figura 1.3. Sintesi e struttura molecolare del PCL.

settimane di distanza dalla semina con cellule di midollo osseo di ratto (rBMSC), nella matrice in PCL si osserva la formazione di collagene I e di minerale calcio fosfato, in quella in PLGA una sostanziale perdita delle proprietà strutturali. Nel contributo di Badami *et al.* [5], invece, *scaffold* elettrofilati in PLA vengono testati con cellule osteoprogenitrici di topo (MC3T3-E1). In questo lavoro, le matrici nanofibrose sono confrontate con supporti lisci di polistirene: gli autori dimostrano che la topografia risulta un fattore determinante per la morfologia e la proliferazione delle cellule.

Altri materiali degradabili sono il poli-idrossibutirrato (PHB) e il poli-idrossibutirrato-co-idrossivalerianato (PHBV). Anche in questo caso, gli *scaffold*, seminati con osteoblasti umani (SaOS-2), esibiscono un comportamento migliore nel mantenimento del fenotipo cellulare, rispetto a film omologhi [6].

Appurata, dunque, l'opportunità di riprodurre la morfologia della ECM naturale, gli studi si sono concentrati sulla ricerca di materiali, o combinazioni di materiali, più idonei alla crescita cellulare. I polimeri sintetici sono, infatti, per loro natura, piuttosto idrofobici e questa caratteristica è di ostacolo all'attecchimento iniziale delle cellule. Per favorire, quindi, l'adesione e il popolamento, si è ricorsi all'unione tra polimeri sintetici e polimeri naturali; quest'ultimi migliorano, allo stesso tempo, biocompatibilità e idrofilicità dei composti. I polimeri che ne risultano, per questa loro ambivalenza, possono essere definiti biosintetici.

In [7], per esempio, il PCL viene mescolato con gelatina. La matrice ottenuta mostra di favorire l'infiltrazione da parte di cellule BMSC, rispetto ad uno *scaffold* del solo polimero. Anche matrici di PLA e gelatina, in varie proporzioni, incrementano la vitalità degli osteoblasti, rispetto a nanofibre

di puro PLA [8].

I polimeri naturali sono stati elettrofilati anche senza l'ausilio di materiali sintetici. Il collagene di tipo I è quello più studiato per l'*electrospinning*, in qualità di componente organico principale della ECM dell'osso. Per essere disciolto e, dunque, elettrofilato, il collagene richiede l'utilizzo di solventi organici (alcoli fluorurati). Al momento attuale, ricorre un dibattito sul fatto che questi ultimi comportino o meno la denaturazione della tipica struttura in tripla elica del tropocollagene. A favore di questa tesi, diverse prove sono state addotte in [9]. Nel lavoro di Zeugolis *et al.* si propone, piuttosto, di utilizzare il collagene come *coating* di *scaffold* ottenuti elettrofilando altri materiali.

Anche la fibroina della seta è stata selezionata come potenziale substrato, in quanto biocompatibile e biodegradabile. Nel contributo di Jin *et al.* [10], si dimostra come le nanofibre di seta siano in grado di incrementare l'adesione e la crescita di cellule staminali del midollo osseo umano (hBMSC). In realtà, in questo studio, per l'*electrospinning* si utilizza una soluzione di fibroina e polietilenossido (PEO) in acqua. Il polimero viene introdotto allo scopo di aumentare la viscosità della soluzione che, altrimenti, sarebbe troppo bassa, compromettendo la struttura della matrice risultante. Lo *scaffold* così ottenuto viene immerso per 2 giorni: in tal modo si permette al PEO di sciogliersi completamente e, di fatto, si ottiene una matrice di sola fibroina. Con la graduale estrazione del PEO, si osserva una crescente proliferazione cellulare. Questo a dimostrare che il polimero naturale possiede caratteristiche, soprattutto molecolari, molto gradite alle cellule. Esso, è, oltretutto, in grado di promuovere la deposizione di minerali di calcio fosfato, formando nanocompositi di seta-apatite. Le prove sperimentali di questa affermazione sono riportate in [11]: in questo lavoro alla soluzione di seta/PEO viene aggiunto poliaspartato (poli-Asp), come molecola mimetica delle proteine non-collageniche dell'osso. La seta, una volta associata a questa molecola, agisce da template per la mineralizzazione.

Il chitosano è un altro polimero naturale che è stato utilizzato nell'*electrospinning* di nanofibre. A differenza degli altri, però, è relativamente difficile da processare; questo in ragione dei pochi solventi disponibili e dell'elevata viscosità anche alle basse concentrazioni. Alcuni ricercatori in [12] testano gli *scaffold* elettrofilati su cellule di osteosarcoma umano (MG63), sia in *in vitro* che *in vivo*. In particolare, lo *scaffold* in chitosano viene utilizzato per la riparazione di un piccolo difetto nel cranio di un coniglio. A 4 settimane dall'impianto, è possibile osservare la formazione di nuovo osso, con la quasi completa rimarginazione della ferita.

Da quanto riportato, i polimeri sintetici, naturali o biosintetici sembrano incentivare piuttosto bene la crescita di osteoblasti e delle loro cellule progenitrici/staminali. Tuttavia, per rafforzare l'espressione fenotipica e la differenziazione, si è pensato di ricorrere a materiali inorganici bioattivi. Lo scopo è quello di ricreare la matrice ossea anche nella sua componente inorganica, che lo contraddistingue dagli altri tessuti connettivali. Si è proceduto, quindi, all'inclusione di calcio-fosfati, vetri e ceramiche bioattive.

L'*electrospinning* di materiali inorganici è ben documentato, anche se, principalmente, non per scopi biomedicali. Alcune ricerche hanno esplorato questa possibilità solo molto recentemente. Nel caso di applicazioni di Ingegneria tessutale, l'*electrospinning* di materiali inorganici si accompagna all'utilizzo di polimeri come polivinilalcol (PVA), polietilenossido (PEO) e polivinilpirrolidone (PVP), i quali forniscono le giuste proprietà viscoelastiche alla soluzione che deve essere elettrofilata.

Nel lavoro di Kim *et al.* [13] si illustra la generazione di nanofibre di vetro bioattivo. Un vetro sol-gel a base di silice e polimero, viene prima elettrofilato e poi trattato termicamente. Si vede come le nanofibre di vetro inducono la formazione di una fase di apatite, simile a quella minerale dell'osso: il substrato stimola attivamente l'adesione di cellule rBMSC e la loro differenziazione osteogenica, più di quanto non avvenga nei controlli (un vetro bioattivo sinterizzato e nanofibre di PCL). In approcci paralleli, si utilizzano nanofibre inorganiche di idrossiapatite (HA) [14][15][16], fluoro-idrossiapatite (FHA) [14] e silice [17]. In particolare, nell'ultimo articolo si nota come gli *scaffold* contribuiscano con successo alla proliferazione di osteoblasti (MG63).

L'uso esclusivo di materiali inorganici è, tuttavia, limitato per la costruzione di *scaffold* a causa della fragilità delle strutture ottenute. Inoltre, il trattamento termico post-*electrospinning*, ne compromette l'uso come potenziali dispositivi per il rilascio di farmaci. Da qui l'idea di unire una fase organica a quella inorganica, cosa che ha il vantaggio ulteriore di riprodurre bene la composizione della matrice ossea. Questa può, infatti, essere assimilata ad un materiale composito, costituito da fibre di collagene e nanocristalli di HA. Combinare polimeri degradabili con materiali inorganici bioattivi è, quindi, una strategia promettente per generare nanofibre con proprietà di rigenerazione ossea: la fase inorganica migliora le proprietà biologiche delle fibre polimeriche, come biocompatibilità, differenziazione osteogenica e calcificazione della matrice, mentre la fase polimerica riduce la fragilità della struttura, aumenta la flessibilità meccanica ed evita il successivo trattamento termico.

In letteratura, diversi lavori riguardano compositi a base di polimeri naturali e materiali inorganici. Un esempio, sono le nanofibre di gelatina e HA. In [18], i due componenti vengono disciolti in solvente organico e, poi, elettrofilati. I nanocristalli di HA si distribuiscono uniformemente all'interno della matrice di gelatina: ciò è attribuito alla modulazione della precipitazione dei cristalli di HA, operata dalla particolare sequenza di amminoacidi della gelatina. La matrice ibrida mostra un significativo aumento nella differenziazione degli osteoblasti. Sul medesimo principio, sono basati anche i compositi in collagene-HA [19] e in chitosano-HA [20]. In quest'ultimo caso, si utilizza PEO per aiutare il processo di filatura. Questo *scaffold* dimostra di stimolare significativamente la proliferazione cellulare, la deposizione minerale e la morfologia di osteoblasti fetali umani (hFOB), grazie all'osteo-conduttività dell'HA.

Materiali compositi si ricavano anche dall'unione di polimeri sintetici degradabili e di materiali bioattivi inorganici. L'omogeneizzazione, tuttavia, risulta più difficile. PLA, PCL e PHBV rappresentano, in questo senso, una sfida nella combinazione con fasi inorganiche, data la loro natura spiccatamente idrofobica. L'articolo [21] illustra la produzione di fibre composite di PCL-CaCO₃. Esse hanno buona affinità per l'acqua e proprietà meccaniche favorevoli all'adesione e alla crescita di osteoblasti. Nella maggior parte dei casi, però, il problema nell'utilizzo di nano-particelle ceramiche rimane quello di combinare la loro idrofilicità con solventi organici e polimeri idrofobici: tendono, quindi, ad aggregare facilmente, dando gocce durante l'*electrospinning*, anziché fibre. Si sono proposte diverse soluzioni al problema: compositi di PLA-HA, ottenuti introducendo un surfactante alla soluzione da elettrofilare [22] e compositi di gelatina-silossano, che ha un effetto di cross-link sulle catene di gelatina [23].

Una strategia alternativa per aumentare l'affinità dello *scaffold* per le cellule è il *coating*. Questa procedura consente di sfruttare il rapporto superficie-volume estremamente grande dei costrutti elettrofilati. La funzionalizzazione viene fatta con materiali osteo-attivanti, proteine, peptidi e antibiotici.

In [24], si impiega una soluzione di collagene I e di copolimero polilattico-poliglicolico (PLGA), per l'*electrospinning* e, successivamente, si procede al *coating* dello *scaffold* con E-selectina, una proteina adesiva. L'incorporazione di questa glicoproteina promuove un'adesione più rapida ed efficace di cellule staminali ematopoietiche derivate dall'osso (BMHSC), rispetto allo stesso *scaffold* non trattato. In [25], nanofibre di PCL sono mineralizzate con apatite, per mezzo di una serie di trattamenti in soluzione. La mineralizzazione comporta un'attivazione maggiore da parte degli osteo-

blasti, in termini di adesione, popolamento ed espressione di geni correlati alla ECM. In [26], un peptide contenente la sequenza adesiva RGD, viene immobilizzato covalentemente sulla superficie di nanofibre in PLGA. L'incorporazione del peptide aumenta l'adesione, lo *spreading* e la proliferazione cellulari. Un altro studio ha sviluppato nanofibre di copolimero polilattico-policaprolattone (PLCL), legando covalentemente alla matrice elettrofilata un peptide della fibronectina (FN10) [27]. Anche in questo caso, ciò che si osserva è un miglioramento dell'adesione iniziale e dello *spreading* degli osteoblasti. Applicazioni parallele suggeriscono di utilizzare proteine e peptidi target per l'osso, come fattori di crescita e proteine della famiglia delle BMP.

Anche il *coating* ha, però, degli svantaggi: da un lato si rischia di ricoprire soltanto la superficie dello *scaffold*, e non la superficie di tutte le nanofibre (per esempio, di quelle più interne), dall'altro non sempre le molecole legate mantengono intatta la naturale bioattività per tutto il tempo programmato. Una via alternativa può, quindi, essere quella di incapsulare le biomolecole all'interno delle nanofibre. Questa strategia è stata applicata con successo nella progettazione di sistemi per il rilascio controllato di farmaci. In realtà, non sono stati incapsulati soltanto farmaci, ma anche antibiotici, proteine morfogenetiche dell'osso e geni. L'utilizzo di questo metodo può, quindi, rivelarsi appropriato e alternativo per aggiungere una stimolazione chimica e biologica alle matrici elettrofilate.

Per il rilascio specifico di segnali osteogenici, nel lavoro di Lia *et al.* [28] la BMP-2 viene incorporata direttamente alla soluzione da elettrofilare, composta da fibroina della seta e PEO. Lo *scaffold* dimostra di favorire la differenziazione di hMSC. Infine, nel lavoro riportato in [29] si propone di utilizzare nanofibre elettrofilate a partire da una soluzione di PLGA/HA, contenente nano-particelle di BMP-2 e DNA plasmidico. In particolare, il DNA è precaricato all'interno di chitosano prima dell'*electrospinning*. I risultati dimostrano che la struttura ottenuta è più adesiva rispetto al controllo ed ha una maggiore efficienza di trasferimento del DNA rispetto a quanto si può ottenere per semplice adsorbimento.

1.4.2 Scaffold di peptidi auto-assemblanti

I peptidi auto-assemblanti sono stati utilizzati sia in applicazioni *in vitro*, sia nella rigenerazione *in vivo* dell'osso. Costituiscono, in pratica, un metodo alternativo nella costruzione di biomateriali per la crescita e la differenziazione controllate di cellule e di tessuti.

Nel contributo di Garreta *et al.* [30] si dimostra che fibroblasti embrionici primari di topo (MEF), coltivati in PuraMatrixTM (nome commerciale

del peptide RAD16-I), si differenziano in cellule dell'osso. In questo lavoro, si confrontano due strutture: una 2D, l'altra 3D. È l'ultima di queste a fornire i risultati migliori, in termini di mineralizzazione della matrice, sintesi di collagene I, attività dell'ALP. Analoghi risultati si ottengono in [31].

Se ne deduce che, alle proprietà intrinseche dell'ambiente tridimensionale, va aggiunta la presenza della sequenza Arg-Ala-Asp (RAD) del PuraMatrixTM, molto simile al motivo RGD. Si è, perciò, pensato che un ulteriore arricchimento del supporto con motivi funzionali, potesse spingere ulteriormente l'adesione e il popolamento da parte delle cellule.

È quanto riportano gli autori in [32], dove le strutture auto-assemblate sono ottenute a partire da un peptide anfifilico contenente la sequenza RGD. La sua introduzione non solo incrementa l'omogeneità di distribuzione delle cellule all'interno dello *scaffold*, ma anche la successiva formazione di osso. Allo stesso principio si appellano Zhang *et al.* [33]. In questo lavoro viene progettato un nuovo peptide, RGDA16, con due unità RGD, a partire dal più noto RADA16. I due peptidi sono stati combinati a dare un nuovo *scaffold*, il quale viene seminato con cellule MC3T3-E1. Il supporto, per così dire misto, dimostra di aumentare l'adesione iniziale e la proliferazione rispetto ad uno realizzato in puro RADA16.

La sequenza RGD non è stata l'unica ad essere utilizzata per accrescere il potenziale di adesione di queste strutture. In [34], per esempio, vengono impiegati anche i segnali ALK, che regola la crescita osteogenica, e DGR, che media l'adesione dell'osteopontina. In questo lavoro, si ribadisce come l'inclusione dei due segnali promuova la differenziazione osteogenica di MC3T3-E1 e, conseguentemente, la rigenerazione dell'osso.

I peptidi auto-assemblanti sono stati analizzati anche *in vivo*. Misawa *et al.* [35], per esempio, iniettano PuraMatrixTM in piccoli difetti ossei nel cranio di topi. Nelle cavie di controllo, invece, utilizzano MatrigelTM: si tratta di un materiale d'uso frequente in colture cellulari, a base di laminina, collagene e fattori di crescita, tra cui fattori di crescita dell'epidermide (EGF) e fattori di crescita derivati dalle piastrine (PDGF). I risultati di adesione si dimostrano più favorevoli per il PuraMatrixTM e l'osso neoformato che ne deriva risulta, inoltre, più forte.

Si è visto che i motivi di funzionalizzazione comportano la capacità di istruire, in un certo qual modo, le cellule. Si è, quindi, sfruttato il signaling molecolare anche per indurre il processo di mineralizzazione. Per esempio, la proteina 1 della matrice della dentina (DMP1) è una fosfoproteina presente nell'osso e coinvolta nella biomineralizzazione. Essa auto-assembla in presenza di calcio, formando aggregati. He *et al.* utilizzano, in particolare,

due domini della DMP1: ESQES e QESQSEQDS [36]. I due peptidi, solubilizzati in proporzione 1:1 in presenza di calcio, sviluppano nanofibre in β -sheet. Quest'ultime inducono la formazione di cristalli di HA del tutto simili a quelli osservati *in vitro* con la DMP1. Gli autori di [37] sintetizzano un peptide anfifilico che auto-assembla in soluzioni acquose dando nanofibre e che è capace di promuovere la nucleazione di cristalli di HA e l'adesione cellulare. Il biomateriale progettato mima un processo di mineralizzazione naturale, dove i cristalli di HA sono disposti parallelamente agli assi delle fibre. Mata *et al.* in [38] si muovono sempre su questa linea e, nel loro lavoro, sintetizzano un peptide, la cui sequenza amminoacidica simula quella delle sialoproteine dell'osso. La matrice artificiale ha un'alta affinità per gli ioni calcio e induce la mineralizzazione. Lo *scaffold* viene testato *in vivo* su piccoli difetti nel femore di topi ed, a 4 settimane dall'impianto, dimostra una maggiore formazione di osso, rispetto a cavie trattate con matrice ossea allogenica.

Alcuni autori hanno cercato di indurre la mineralizzazione attraverso l'uso combinato di peptidi auto-assemblanti e di polvere di HA [39]. Quest'ultima mostra, effettivamente, di incrementare la mineralizzazione della matrice da parte di cellule MESC. In un recente lavoro [40], Tambralli *et al.* propongono, invece, di ricoprire nanofibre elettrofilate di PCL con un peptide auto-assemblante, da loro sintetizzato. La procedura consente da un lato di conservare la morfologia e la porosità della struttura uscente dal processo di *electrospinning*, dall'altro di funzionalizzare lo *scaffold* con sequenze adesive opportune. In particolare, l'inclusione del peptide induce la differenziazione di cellule hMSC e il mantenimento del fenotipo differenziato, rendendo superflua la necessità di terreni di coltura arricchiti con segnali osteogenetici.

1.5 Scopo della Tesi

Con il presente lavoro di tesi, si intende indagare la possibilità di costruire matrici elettrofilate ibride, a base di polimeri e di peptidi auto-assemblanti.

Nel breve *excursus* sullo stato dell'arte in materia di Ingegneria tessutale ossea, è facile notare quale sia la tendenza prevalente: obiettivo comune è tentare di determinare le condizioni migliori per l'ottenimento di matrici stabili meccanicamente e, allo stesso tempo, osteo-induttive. L'*electrospinning* è una tecnica semplice, l'allestimento veloce ed offre la possibilità di filare una grande quantità di polimeri. Inoltre, non è difficile includere sequenze adesive attraverso il *coating* delle nanofibre o filare soluzioni di polimeri naturali e sintetici, con solventi opportuni. I peptidi

auto-assemblanti sono definibili in sede di progettazione. La loro sequenza può essere adattata in funzione dei segnali che si desiderano esprimere all'interno della matrice. Con essi, si ottengono ambienti tridimensionali, facilmente popolabili dalle cellule.

Entrambi i metodi si sono dimostrati validi per la fabbricazione di *scaffold*, ma entrambi presentano alcune fragilità. L'*electrospinning* di polimeri sintetici dà le strutture più processabili e più stabili meccanicamente; tuttavia, queste sono, in genere, idrofobiche. Il *coating* delle fibre elettrofilate non garantisce, da solo, risultati ottimali, non potendo avere un controllo sufficiente sulla quantità di molecole immobilizzate per adsorbimento, né sulla loro velocità di rilascio. Le strutture auto-assemblanti hanno un'architettura molto somigliante a quella della matrice extracellulare, ma hanno la consistenza di gel e, in quanto tali, non possono essere rilasciati. Possono essere iniettati localmente, per piccoli difetti, ma è difficile costruire *patch* in grado di coprire aree più consistenti, così come maneggiarli in sala operatoria.

Date queste premesse, si è deciso di unire i due approcci. Il lavoro sperimentale ha compreso:

- la preparazione degli *scaffold* mediante *electrospinning* di soluzioni di polimero (PCL) e di peptidi auto-assemblanti;
- la caratterizzazione delle matrici elettrofilate ottenute: analisi morfologica, analisi chimica della struttura dei peptidi, analisi termica e determinazione della bagnabilità di superficie con misure di angolo di contatto;
- la semina sulle matrici con osteoblasti umani: adesione cellulare, determinazione del calcio, espressione di geni correlati all'adesione e mineralizzazione della matrice.

Capitolo 2

Metodi

In questo capitolo vengono descritti, in breve, i principali metodi utilizzati per la fabbricazione e l'analisi degli *scaffold* prodotti nella sezione sperimentale.

Per ciascuna tecnica sono analizzati i principi teorici e il tipo di analisi restituita.

2.1 Sintesi e Purificazione dei Peptidi Auto-Assemblanti

I peptidi possono essere sintetizzati legando tra loro, nella giusta sequenza, gli amminoacidi di cui sono composti.

La sintesi è un'operazione molto complessa, nonostante consista nella realizzazione di un solo tipo di legame, quello ammidico, tra il gruppo carbossilico di un amminoacido e il gruppo amminico dell'amminoacido successivo: è, infatti, necessario aver cura che non si formi nessuno tra gli altri legami possibili, dovuti alla reattività tra gruppi funzionali in catena laterale. Quest'ultimi devono, pertanto, essere protetti durante la reazione di sintesi, affinché non interferiscano con il processo di allungamento della catena. La loro "inibizione" avviene con l'utilizzo di gruppi protettori.

La tecnica di sintesi di peptidi ad oggi più utilizzata prende il nome di sintesi su fase solida (solid phase peptide synthesis, SPPS). Con la SPPS, la catena peptidica viene accresciuta su un polimero insolubile (resina), a cui risulta legata covalentemente per mezzo del primo amminoacido. In questo modo, i reagenti in eccesso e i sottoprodotti di sintesi possono essere rimossi per semplice filtrazione e lavaggio del polimero. Questa tecnica ha reso la sintesi di peptidi molto veloce e ha consentito la sua automatizzazione. Con essa si possono preparare peptidi lunghi fino a 30 amminoacidi.

Le due chimiche più comuni per la sintesi di catene peptidiche tramite SPPS si basano sulla reattività dei gruppi impiegati come protettori del terminale α -amminico: Fmoc (fluorenyl-9-methoxycarbonyl) e t-Boc (tert-butyloxycarbonyl), il primo rimosso in ambiente basico, il secondo in ambiente acido.

Nonostante la resa del processo sia mantenuta prossima al 100% ad ogni iterazione del ciclo di aggiunta di un amminoacido, il peptide risultante presenta sempre qualche impurità. È necessario, di conseguenza, ricorrere ad una purificazione del grezzo ottenuto. Per fare ciò si utilizza la cromatografia liquida ad alta prestazione (high performance liquid chromatography, HPLC).

Con il termine di cromatografia si indica un insieme di metodiche atte a separare i singoli componenti di miscele complesse. Il campione viene sciolto in una fase mobile (gas o liquido) e fatto passare attraverso una fase immiscibile, detta stazionaria. Quegli elementi della miscela che vengono trattenuti maggiormente dalla fase stazionaria si muovono più lentamente con il flusso della fase mobile, mentre quelli trattenuti debolmente si muovono più rapidamente. Questa diversa mobilità provoca la separazione dei componenti del campione che, quindi, possono essere analizzati separatamente oppure isolati e raccolti. L'HPLC si caratterizza per l'accuratezza, i tempi ridotti di esecuzione e la sensibilità di misura.

Un tipo di cromatografia molto utile nella purificazione dei peptidi è quella a fase inversa (reversed-phase chromatography, RP-HPLC), la quale permette di separare le molecole sulla base delle differenze di idrofobicità. In questo caso, i costituenti dell'analita vengono divisi grazie alla diversa interazione (idrofobica o polare) della fase liquida con quella stazionaria.

I picchi di desorbimento in uscita dalla colonna sono letti e rilevati con tecniche diverse (IR, UV-VIS, spettrofluorimetro, spettrometro di massa) ed elaborati al calcolatore. L'analisi in continuo del flusso in uscita permette di quantificare e/o identificare le sostanze iniettate.

Per i peptidi, la lettura UV viene eseguita a 214 nm.

2.2 Microscopia a Scansione Elettronica

Il microscopio elettronico a scansione (scanning electron microscope, SEM) è uno strumento elettro-ottico. Si basa sull'emissione di un fascio elettronico e sulla successiva analisi dei segnali prodotti dall'interazione del fascio con il campione in esame.

Con il SEM si possono analizzare campioni di varie tipologie, sia per natura (unica eccezione i materiali contenenti fluidi), che per forma e di-

mensioni (fino a circa 1 dm^3). Il vincolo è che i campioni siano conduttivi: se non lo sono naturalmente è sufficiente ricoprirli con un sottilissimo strato di materiale conduttore (oro o grafite).

Il SEM è costituito dai seguenti elementi (figura 2.1):

- una colonna elettronica, dove viene creato il fascio di elettroni;
- una camera da vuoto, dove il fascio elettronico interagisce con il campione;
- vari tipi di rilevatori, che acquisiscono i segnali dell'interazione fascio-campione e li trasferiscono agli elaboratori;
- uno schermo, in cui l'immagine viene ricostruita.

La sorgente elettronica, posta in cima alla colonna, è costituita da un filamento, comunemente di tungsteno, che, portato ad elevata temperatura, produce elettroni per effetto termoionico. Gli elettroni vengono accelerati ad energia variabile tra alcune centinaia e alcune decine di migliaia di eV (in genere da 200 eV a 30 keV), grazie a un anodo posto sotto il filamento. Il fascio che emerge è divergente, ma viene fatto riconvergere e focalizzato da numerose lenti elettromagnetiche e da fenditure all'interno della colonna. All'estremità inferiore di quest'ultima, una serie di bobine di scansione deflette il fascio fornendogli un movimento alternato lungo linee parallele ed equidistanti, di modo che, una volta raggiunta la superficie del campione, vada a colpirne un'area predefinita. Il materiale da esaminare si trova all'interno della camera da vuoto. Penetrando all'interno del campione, gli elettroni del fascio perdono energia, che viene riemessa dal materiale in varie forme: elettroni (secondari, retrodiffusi, assorbiti, trasmessi, Auger), coppie elettrone-lacuna, radiazione elettromagnetica (nello spettro UV-IR) e radiazione X.

A differenza del microscopio ottico, che fornisce un'immagine reale del preparato in esame, il SEM restituisce un'immagine virtuale a partire dai segnali emessi dal campione. Essi variano di intensità, punto per punto, in funzione delle anisotropie morfologiche, chimiche e strutturali del campione. Tali segnali vengono raccolti, convertiti in digitale, elaborati e visualizzati su uno schermo a tubo catodico (cathode ray tube, CRT). L'intensità del segnale selezionato modula il pennello del CRT, la cui deflessione avviene in sincronia con il fascio. In questo modo, il sistema riporta il segnale sul monitor, facendo corrispondere ad ogni punto un pixel.

In particolare, l'immagine prodotta dagli elettroni secondari (elettroni a bassa energia, fino a poche decine di eV) proviene dalla porzione più

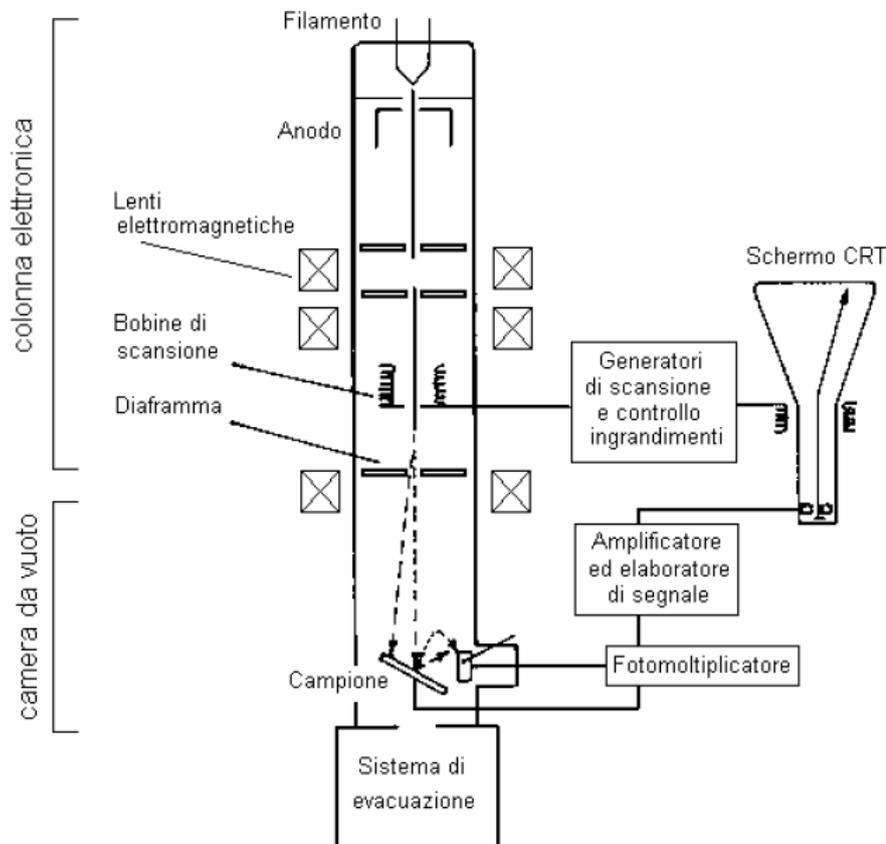


Figura 2.1. Schema generale del microscopio elettronico a scansione (SEM).

superficiale del campione (pochi nm). La proprietà principale di questo tipo di segnale è quella di essere fortemente controllato dalla morfologia. Pertanto, l'immagine risultante è quella in bianco e nero dell'area interessata dalla scansione del fascio: il contrasto delle tonalità di grigio mette in risalto l'aspetto tridimensionale dell'oggetto in esame.

Questa non è l'unica analisi che è possibile fare con il SEM: ogni tipo di emissione è potenzialmente un segnale dal quale creare un'immagine. Per approfondire queste tematiche si rimanda al riferimento bibliografico [41].

2.3 Spettroscopia Infrarossa in Trasformata di Fourier

La spettroscopia infrarossa (Fourier transform infrared, FTIR) misura l'assorbimento di radiazione IR da parte di un campione posizionato.

Lo spettro che risulta da questa interazione crea una sorta di “impronta digitale” del campione; non ci sono, infatti, due strutture molecolari differenti che producano lo stesso spettro. Questo rende la spettroscopia IR utile per diversi tipi di analisi, tra cui l'identificazione di materiali sconosciuti e la determinazione di qualità, consistenza o composizione di un campione.

Uno strumento FTIR è costituito da (figura 2.2):

- una sorgente, che emette radiazione elettromagnetica nell'infrarosso;
- un interferometro di Michelson, a sua volta costituito da tre specchi (uno semiriflettente, uno fisso e uno mobile), che produce i pattern di interferenza;
- un rilevatore, che misura l'interferogramma;
- un computer, che esegue la trasformata di Fourier del segnale digitalizzato.

La sorgente luminosa ad incandescenza emette una radiazione policromatica nel campo dell'IR; questa giunge allo specchio semiriflettente (o *beamsplitter*) che divide il fascio: metà viene indirizzato allo specchio fisso, metà allo specchio mobile. Dopo la riflessione, i due raggi ritornano al *beamsplitter*, dove interferiscono, costruttivamente o distruttivamente. Il fascio che emerge è un insieme complesso di modulazioni di frequenze, che derivano dalla differenza nei cammini ottici dei due raggi. Il fascio passa al compartimento del campione, dove può attraversare o essere riflesso dalla superficie del materiale in esame, a seconda del tipo di analisi scelta (modalità di trasmissione o di riflessione, rispettivamente): è qui che le frequenze di energia specifiche del composto sono assorbite. Dopo di ché, il fascio viene focalizzato sul detector. Il segnale rilevato viene campionato ad intervalli ben definiti, in cui è nota la posizione dello specchio mobile. Sia la frequenza di campionamento che la velocità di questo specchio sono controllate da un segnale di riferimento, prodotto dalla modulazione di un fascio laser. In questo modo, l'intensità della radiazione che giunge al detector è funzione della posizione dello specchio. Questo segnale prende il

nome di interferogramma e contiene tutte le informazioni utili a ricostruire lo spettro.

In genere, si eseguono più scansioni (di solito 32 della durata approssimativa di 60 s) e si prende in considerazione l'interferogramma medio per la ricostruzione finale. Per ottenere un plot dell'intensità in funzione del numero d'onda è necessario applicare al segnale la trasformata di Fourier. Il tempo dall'inserzione del campione al plot completo è di ca. 2 min.

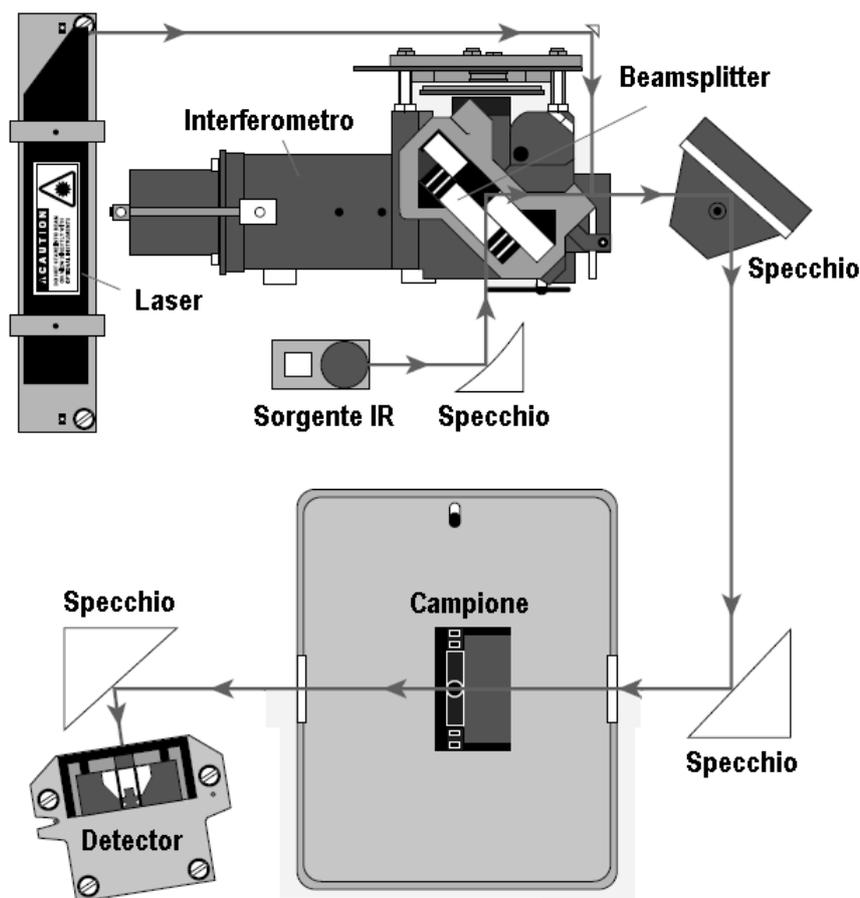


Figura 2.2. Schema generale dello spettrometro IR in trasformata di Fourier (FTIR).

Per l'analisi di polimeri e di peptidi, è sufficiente analizzare lo spettro

nel medio infrarosso (medium infrared, MIR; 4000-500 cm^{-1}).

L'assorbimento di radiazione IR induce nelle molecole del campione essenzialmente due tipi di moti vibrazionali: stretching (stiramento) e bending (piegamento). Lo stiramento è il risultato di una continua variazione delle distanze di legame tra due atomi; il piegamento, invece, si riferisce alla modifica dell'angolo di legame dentro o fuori dal piano su cui sono situati gli atomi considerati. L'apporto di energia necessario a produrre uno dei moti vibrazionali dipende direttamente dalla forza e dalla polarità dei legami tra gli atomi della molecola analizzata. Ogni picco nello spettro IR corrisponde, di conseguenza, all'assorbimento di energia da parte di un particolare legame o di un gruppo di legami in vibrazione. In tabella 2.1, sono riassunte le principali regioni dello spettro MIR.

Numeri d'onda (cm^{-1})	Tipo di assorbimento	Nome della regione
3400-2800	stretching O-H, N-H, C-H	
2250-2100	stretching C \equiv N, C \equiv C	gruppi funzionali
1850-1600	stretching C=O, C=N, C=C	
1600-1000	stretching C-C, C-O, C-N vari tipi di bending	impronta digitale
1000-600	bending C-H	bending C-H

Tabella 2.1. Regioni dello spettro infrarosso.

Il gruppo peptidico, in particolare, dà fino a 9 bande caratteristiche, chiamate amide A, B, I, II, III, IV, V, VI e VII, ma, generalmente, le bande amide I e amide II sono le principali nello spettro IR delle proteine.

La banda amide I (1660-1620 cm^{-1}) è associata alla vibrazione di stretching del legame C=O. L'esatta posizione è determinata dalla conformazione e dal pattern di legami a idrogeno.

La banda amide II (1550-1510 cm^{-1}) deriva soprattutto dalla vibrazione di bending del legame N-H.

L'analisi IR della posizione della banda amide I è estremamente utile a chiarire la struttura secondaria dei peptidi: le conformazioni in β -sheet assorbono mediamente a 1640-1615 cm^{-1} , quelle in α -elica a 1650 cm^{-1} .

2.4 Calorimetria a Scansione Differenziale

La calorimetria a scansione differenziale (differential scanning calorimetry, DSC) monitora gli effetti del calore associati alle transizioni di fase e alle reazioni chimiche di un materiale, in funzione della temperatura.

Le applicazioni più comuni di questa tecnica riguardano lo studio di materiali a matrice polimerica, in termini di cinetica di cristallizzazione, determinazione del calore specifico e calcolo delle temperature di fusione e di transizione vetrosa.

Nella maggior parte degli strumenti DSC, l'apparecchiatura è costituita da:

- una cella;
- una fornace programmabile;
- un registratore;
- un sistema di raffreddamento e controllo.

I campioni (test e riferimento), contenuti in opportune capsule (crogioli), sono collocati su apposite piattafirme, poste simmetricamente sulla base della cella e munite di termocoppie per la misura della temperatura. Il riferimento può anche essere, semplicemente, una capsula vuota. Il campione, di norma, deve pesare pochi milligrammi. I crogioli sono scelti per resistere alle temperature di prova senza interagire con il materiale in esame.

Il funzionamento si basa sulla rilevazione e registrazione, in forma di termogramma, dei fenomeni esotermici ed endotermici che avvengono nel provino di test, durante i processi chimico-fisici indotti da variazioni di temperatura. Ciò avviene misurando la differenza tra il calore, assorbito o ceduto dal campione, e il calore del materiale inerte di riferimento, sottoposto allo stesso programma termico (di solito, una rampa lineare di temperatura). Il diagramma che si ottiene riporta il calore scambiato (heat flow) in funzione della temperatura ed è proporzionale al calore specifico del campione. Se, raggiunta una determinata temperatura, si verifica una transizione di fase nel materiale, questa si accompagna ad un cambiamento nel calore specifico e produce una discontinuità nel segnale di alimentazione, che si preoccupa di mantenere costantemente nulla la differenza tra campione e riferimento. I cambiamenti esotermici o endotermici di entalpia determinano, quindi, dei picchi, la cui area è proporzionale al cambiamento totale di entalpia, normalizzata alla quantità di sostanza presente. In particolare, l'analisi delle temperature di transizione vetrosa (T_g) e di fusione (T_m), fornisce indicazioni sulla struttura interna del polimero: la T_g , infatti, indica che esiste nel polimero una qualche struttura amorfa, mentre la presenza di un picco T_m indica una struttura cristallina.

2.5 Angolo di Contatto

L'angolo di contatto è indicativo della capacità di un liquido di distribuirsi su una superficie.

Il metodo consiste nella misura dell'angolo tra la tangente al profilo di una goccia, depositata sulla superficie del campione, e la superficie stessa.

Questo metodo di indagine fornisce diverse informazioni sul carattere della superficie esaminata: bagnabilità (se si utilizza acqua), energia superficiale (se si utilizzano liquidi diversi), omogeneità (con l'isteresi tra angolo di avanzamento e angolo di arretramento di una goccia in movimento sulla superficie).

Lo strumento che misura l'angolo di contatto consiste di tre elementi:

- una piattaforma, che ospita il campione;
- una sorgente di luce;
- una telecamera interfacciata ad un computer.

Ad una estremità della piattaforma si trova la sorgente di luce, mentre all'altra estremità si trova l'ottica di misura. Un software consente di catturare le immagini e di misurare l'angolo di contatto del liquido sulla superficie solida.

Nel caso di campioni ad uso biomedico, il parametro più importante è la bagnabilità del materiale.

La goccia d'acqua posta sulla superficie piana del campione tende ad allargarsi quando la superficie è bagnabile, viceversa, assume una forma sferica quando la superficie non è bagnabile (figura 2.3).

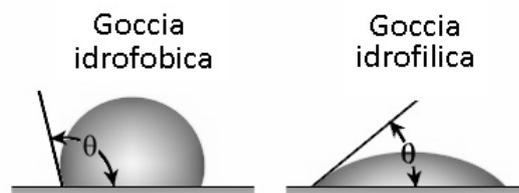


Figura 2.3. Misura dell'angolo di contatto su una superficie idrofilica e una idrofobica.

In pratica, se con θ si indica l'angolo di contatto, sono possibili tre situazioni:

- $\theta=0^\circ$, la superficie è completamente bagnabile;
- $0^\circ<\theta<90^\circ$, la superficie è parzialmente bagnabile;
- $\theta>90^\circ$, la superficie non è bagnabile.

Angoli di contatto bassi sono, di conseguenza, auspicabili per un biomateriale che debba essere colonizzato dalle cellule.

2.6 Test MTT

Il test MTT serve a determinare la crescita cellulare di una coltura. Le cellule vengono contate sfruttandone il viraggio nella colorazione, dovuto al trattamento con una particolare sostanza, sensibile alla loro vitalità.

L'MTT (bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) è un composto di colore giallo, che viene ridotto dai mitocondri delle cellule viventi e trasformato in formazano, una sostanza di colore blu/violaceo. La riduzione ha luogo solo se gli enzimi riduttasi dei mitocondri sono attivi: la conversione può, quindi, essere direttamente correlata al numero di cellule viventi.

Il metodo MTT viene utilizzato in saggi di citotossicità, nella determinazione della crescita cellulare in risposta ad agenti mutageni, a stimoli antigenici, a fattori di crescita e in saggi di adesione. Nel seguito, si riporta la procedura relativa a quest'ultima circostanza.

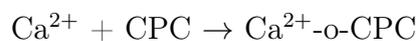
Una soluzione di MTT viene aggiunta al materiale di test, sul quale, preliminarmente, sono state lasciate aderire le cellule per un tempo opportuno. Il supporto assume, in questo modo, una colorazione giallognola. Le deidrogenasi mitocondriali delle cellule aderite (e viventi) clivano l'anello tetrazolio, producendo cristalli di formazano di colore viola, insolubili in acqua. Il formazano, invece, non passa attraverso la membrana citoplasmatica e una volta prodotto si accumula all'interno delle cellule. Segue un periodo di incubazione, al termine del quale il terreno-MTT viene rimosso e ad ogni campione viene aggiunta una soluzione solubilizzante l'MTT. Il tutto viene messo ad agitare per assicurarsi che i cristalli si sciolgano e formino una soluzione omogenea. Infine, si misura la densità ottica della soluzione finale, grazie ad uno spettrofotometro, selezionando una lunghezza d'onda opportuna (di solito tra 500 e 600 nm). L'assorbanza è direttamente proporzionale alla quantità di formazano e, a sua volta, al numero di cellule.

La misura può essere espressa relativamente ad un campione, scelto come controllo. Per avere una quantificazione assoluta del numero di cellule, è necessario costruire una curva standard nel piano che correla numero di cellule e densità ottica; di norma sono sufficienti 5 punti. Nella pratica, questi si ottengono misurando l'assorbanza di pozzetti in cui sia noto, per altra via, il numero di cellule presenti.

2.7 Metodo o-CPC

Il saggio o-CPC consente la determinazione della concentrazione di calcio presente in una coltura *in vitro*, per mezzo di una misura colorimetrica. La quantità di calcio rappresenta un utile indicatore sul grado di mineralizzazione della matrice prodotta dalle cellule.

La o-cresoltaleina complessone (o-CPC) è un indicatore acido-base in grado di formare complessi colorati con metalli diversi, a seconda delle condizioni di reazione. La o-CPC reagisce con il calcio e il magnesio in soluzione fortemente alcalina a formare un complesso di colore rosa. Spesso vengono incorporati al reagente sia 8-idrossichinolina, in quanto lega preferenzialmente il magnesio e, quindi, ne previene l'interferenza, sia 2-amino-2-metil-1-propanolo, il quale evita il viraggio prematuro del colore e consente di operare a pH meno alcalini. La o-cresoltaleina complessone reagisce con gli ioni calcio, formando un complesso color porpora.



L'intensità del colore viene misurata con uno spettrofotometro, generalmente tra i 550 e i 650 nm. L'assorbanza è direttamente proporzionale alla concentrazione di calcio presente nel campione esaminato. Al fine di normalizzare i livelli di calcio alla densità di cellule effettivamente presenti, è possibile far riferimento alla concentrazione proteica in ciascun campione.

2.8 Analisi rt-PCR dell'Espressione Genica

L'analisi dell'espressione genica di una coltura *in vitro* è funzionale alla caratterizzazione del fenotipo cellulare. Il livello dell'mRNA trascritto, infatti, è correlabile all'espressione di proteine caratteristiche del fenotipo analizzato.

Questa analisi si basa, essenzialmente, sulle procedure di trascrizione inversa e rt-PCR quantitativa (real-time polymerase chain reaction,

rt-PCR). Ad oggi è possibile rilevare l'RNA trascritto da ogni gene, indipendentemente dalla quantità iniziale di materiale o dall'abbondanza di mRNA specifico.

Nella rt-PCR si copia un RNA template in DNA complementare (cDNA), utilizzando una trascrittasi inversa retrovirale. La sequenza di cDNA di interesse viene poi amplificata esponenzialmente per mezzo della PCR e, simultaneamente, quantificata. In genere, vengono utilizzati dei *prime*, che permettono di circoscrivere a pochi nucleotidi la sequenza da replicare. Quest'ultima deve essere significativa per il gene obiettivo dell'analisi, e, di conseguenza, per la proteina che si desidera monitorare.

La quantificazione delle concentrazioni di RNA specifici può essere assoluta o relativa: nel primo caso è necessario produrre una curva standard di calibrazione, nel secondo è sufficiente rapportare il tutto alla concentrazione misurata per un gene di controllo (o *housekeeping*), che si sappia essere invariante all'espressione dei geni selezionati per l'analisi.

Capitolo 3

Parte Sperimentale

In questa sezione vengono presentati, in dettaglio, i materiali utilizzati nelle procedure sperimentali, le varie fasi di preparazione e realizzazione degli *scaffold*, nonché le procedure di caratterizzazione chimica e biologica degli stessi.

3.1 Materiali e Metodi

3.1.1 Preparazione dei peptidi auto-assemblanti

I peptidi, le sequenze dei quali sono riportate in tabella 3.1, sono stati sintetizzati (Applied Biosystems (Perkin-Elmer Corp., Norwalk, CT, USA; Model 431A), utilizzando la chimica su fase solida fluorenyl-9-methoxycarbonyl (Fmoc) [42]. La purificazione dei peptidi grezzi è stata eseguita attraverso cromatografia liquida a fase inversa (RP-HPLC). Le purezze ottenute sono risultate tutte superiori al 90%. In tabella i peptidi sono presentati con le relative abbreviazioni, le sequenze in codice a una lettera e la conformazione prevalente in soluzione acquosa.

3.1.2 Preparazione delle soluzioni

Si sono preparate sette diverse soluzioni: una, il controllo, a base di solo PCL ($M_n=60000$, Sigma-Aldrich), le altre sei unendo al PCL uno dei peptidi auto-assemblanti EAK, DAK, EAbuK, EYK, RGD-EAK, RGD-EAK sc.

Il PCL netto (100%), usato come controllo, è stato sciolto in HFIP ($\rho=1.596$, Sigma-Aldrich), messo ad agitare 3 h ed elettrofilato, ad una concentrazione totale del 10% (wt/wt). Anche le soluzioni di PCL e peptidi sono state dissolte in HFP, utilizzando un agitatore magnetico per 3 h, ad

Modificazione	Abbreviazione	Sequenza	Struttura
–	EAK	(AEAE AKAK) ₂	β
Glu \rightarrow Asp	DAK	(ADAD AKAK) ₂	α
Ala \rightarrow Abu	EAbuK	(AbuEAbuE AbuKAbuK) ₂	β
Ala \rightarrow Tyr	EYK	(YEYE YKYK) ₂	β - hairpin
+ Arg-Gly-Asp	RGD-EAK	RGD(AEAE AKAK) ₂	β
+ Arg-Gly-Asp scrambled	RGD-EAK sc	RGD(AKAK AEAE AAEK AKAEK)	α

Tabella 3.1. Sequenza e struttura secondaria dei peptidi in soluzione acquosa determinata tramite misure di dicroismo circolare [42]: le sequenze sono ammido-terminali.

una concentrazione totale del 10% (wt/wt). Il rapporto di PLC/peptidi è stata fissato in 95:5.

Si è deciso di preparare il minimo volume necessario ad una deposizione sufficiente di materiale, per evitare spreco di peptidi. Il volume finale scelto per ogni soluzione è stato di 1.5 ml di solvente HFIP ($\rho=1.596$ g/mL), corrispondente a 2.66 g. Di conseguenza, nella soluzione di solo polimero si sono aggiunti 0.266 g di PCL, nelle soluzioni miste, invece, 0.2527 g di PCL e 0.0133 g di peptide, rispettivamente. La concentrazione delle soluzioni, in questo modo, è rimasta invariata: a cambiare è stata solo la composizione in soluto.

3.1.3 Electrospinning

L'apparato di *electrospinning* è stato assemblato a partire da: un generatore di alto voltaggio (Gamma High Voltage), una siringa di 5 ml con ago in acciaio inox smussato 27G (Terumo), una pompa volumetrica (New Era Pump Systems, Inc.) e un collettore, in forma di una piastra quadrata in acciaio inox, ricoperta da un foglio di alluminio.

Le nanofibre di PCL puro e delle soluzioni ibride sono state elettrofilate separatamente, depositandole sul collettore messo a terra. È stata applicata una d.d.p di 16 kV, tra la punta dell'ago e il raccoglitore, e la pompa volumetrica è stata impostata ad una velocità di flusso pari a 1 ml/h. Il

collettore è stato mantenuto ad una distanza di 15 cm dalla punta dell'ago, in posizione ortogonale centrata rispetto a quest'ultimo. È stato utilizzato anche un flusso d'aria con pressione di 0.1 Kg/cm², per circoscrivere l'area di deposizione delle fibre. Per ogni campione, la deposizione è durata 1 h e il processo condotto a temperatura ambiente.

Ciascuno *scaffold*, immediatamente dopo la filatura, è stato seccato 1 h sotto vuoto, per favorire l'evaporazione di eventuali residui di solvente.

3.1.4 Trattamento con tampone salino

Per ognuno dei sei *scaffold* contenenti peptide, si è provveduto a ricavare un campione, che è stato ulteriormente trattato dopo elettrofilatura. Ciascun campione è stato immerso, separatamente, in un tampone salino (150 mM di NaCl, 10 mM di NaH₂PO₄, pH 7.4), per la durata di ca. 3 gg. Infine, ogni *scaffold* è stato risciacquato con acqua MilliQ e seccato, nuovamente, per 1 h sotto vuoto.

3.1.5 Analisi al microscopio elettronico

La morfologia delle fibre è stata valutata con l'aiuto di un microscopio a scansione elettronica (Cambridge Stereoscan 440 SEM), presso i laboratori del Prof. Ramans del nostro ateneo (Ing. K. Brunelli).

I campioni, prima dell'analisi, sono stati ricoperti da un sottile strato di grafite per mezzo di un carbonatore (EMITECH K950x Turbo Evaporator), con una singola deposizione di 1600 ms.

Le immagini sono state prodotte con un voltaggio accelerato di 15 kV e con un dettaglio corrispondente a 30000 ingrandimenti.

La distribuzione dei diametri delle fibre è stata ottenuta, sempre al SEM, con un software di analisi dell'immagine.

3.1.6 Analisi spettroscopica infrarossa

Le misure FTIR di tutti i campioni sono state effettuate con l'uso di un interferometro VECTOR 22 (Bruker) FTIR, equipaggiato con un detector DTGS, operante nel range 4000-400 cm⁻¹, presso il Dip. di Fisica dell'Università Roma Tre (Prof.ssa G. Iucci). Gli spettri in riflessione degli *scaffold* sono stati registrati con un accessorio per serie monolayer/grazing angle (Specac) P/N 19650. L'angolo di incidenza è stato di 70°. La valutazione del curve-fitting è stata fatta utilizzando curve gaussiane.

3.1.7 Analisi calorimetrica

Le caratteristiche termiche degli *scaffold* sono state valutate con un calorimetro a scansione differenziale (DSC 2 Perkin Elmer), presso i laboratori di fisica dei polimeri dell'Istituto Carnot CIRIMAT-CNRS di Tolosa (Dott.ssa V. Samouillan).

Il calorimetro è stato calibrato utilizzando Hg e In, come nella procedura standard. Le accuratezze risultanti sono state di ± 0.1 °C per la temperatura, ± 0.2 J/g per l'entalpia.

I campioni allo stato solido, del peso variabile tra 1 e 5 mg, sono stati riposti in piattini di alluminio e sottoposti a due scansioni. Ogni corsa ha previsto un raffreddamento a -100 °C con un passo di 20 °C/min e un successivo riscaldamento del campione a $+80$ °C, sempre con un rate di 20 °C/min.

3.1.8 Misura dell'angolo di contatto

L'idrofilità delle matrici elettrofilate in PCL e in PCL/peptidi è stata misurata sempre presso i laboratori della Dott.ssa Samouillan. Ciascun campione è stato collocato su un vetrino in silicio. Sulla superficie degli *scaffold* è stata, poi, depositata automaticamente una goccia di acqua deionizzata. Gli angoli di contatto con stati calcolati automaticamente.

3.1.9 Coltura cellulare

Gli osteoblasti umani sono stati isolati dall'osso mandibolare di un uomo sano adulto e coltivati a 37 °C (in atmosfera contenente il 5% di CO_2) in fiasche per coltura cellulare con Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM), addizionato di 20% (v/v) di siero bovino fetale (fetal bovine serum, FBS) inattivato al calore, di 10 U/ml di penicillina e streptomina, di 1% (v/v) di sodio piruvato, di 1% (v/v) di amminoacidi non essenziali e di 1 U/ml di insulina. Al raggiungimento del 90% di confluenza, le cellule sono state staccate mediante incubazione con tripsina e coltivate nel terreno di coltura arricchito con 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ di acido ascorbico, 10 nM di desametasone e 10 mM di β -glicerofosfato, per almeno 10 gg prima di eseguire i saggi sperimentali. Il terreno è stato rinnovato ogni 3 gg. Tutti i reagenti utilizzati per la coltura cellulare sono stati forniti da Gibco, Milano.

3.1.10 Semina delle cellule

Ciascuno *scaffold* è stato ritagliato in forma di disco (14 mm di diametro), per mezzo di un punzone, a partire dal foglio di alluminio su cui è avvenuta la deposizione. Ogni disco è stato fatto aderire all'interno di un pozzetto di piastre in polistirene per colture tessutali da 24 pozzetti (Costar).

Per ogni tipo di campione, sono stati ricavati 6 dischi. Gli *scaffold* sono stati, poi, sterilizzati con etanolo (Carlo Erba) al 20% (v/v) per 10 min e, quindi, lavati con PBS.

Gli osteoblasti sono stati seminati in terreno completo alla concentrazione di 5.7×10^4 cells/cm².

Per il saggio MTT, 3 pozzetti sono stati seminati senza l'ausilio di uno *scaffold*, per osservare il comportamento cellulare della matrice in solo PCL, rispetto al polistirene per colture. Nei pozzetti rimanenti sono stati ancorati 3 dischi per ogni campione (di PCL e di PCL/peptide).

La piastra è stata incubata a 37 °C per 2 h, tempo necessario all'adesione e alla crescita delle cellule. Passato questo tempo, si è provveduto alla rimozione da ogni pozzetto del terreno e delle cellule non adese e al lavaggio con PBS, per poter eseguire il saggio MTT.

Allo stesso modo, la determinazione dei livelli di calcio e dell'espressione dei geni implicati nell'osteogenesi è stata effettuata in triplicato, seminando 3 dischi per ogni tipo di campione (di nuovo, 3 pozzetti sono stati seminati senza *scaffold*).

La coltura destinata alla determinazione dei livelli di calcio è stata protratta per 7 gg, rinnovando il terreno ogni 2 gg, mentre gli osteoblasti seminati per la determinazione dell'espressione genica sono stati coltivati sugli *scaffold* per 24 h.

3.1.11 Saggio MTT

La procedura ha previsto l'aggiunta di una soluzione MTT (5 mg/ml in terreno di coltura) ad ogni pozzetto, previa adesione delle cellule agli *scaffold*. Dopo un periodo di incubazione di 4 h a 37 °C, il terreno-MTT è stato rimosso e ad ogni matrice è stata aggiunta una soluzione di SDS 10% (p/v), acidificata con HCl 0.01 N, in grado di lisare la membrana cellulare e solubilizzare i cristalli di formazano. Il tutto è stato messo ad agitare per 12 h a temperatura ambiente. La misura di densità ottica della soluzione finale è stata effettuata a 620 nm.

La curva standard è stata ricavata determinando le densità ottiche di 10 pozzetti (5 punti in duplicato), di cui era noto il numero di osteoblasti, ottenuto per conta cellulare con camera di Bürker. Dalla determinazione

delle densità ottiche in questi ultimi campioni è stato, quindi, possibile, mediante regressione lineare, determinare la quantità di cellule presente in ogni campione testato.

3.1.12 Determinazione dei livelli di calcio

Per la valutazione del calcio, gli osteoblasti, dopo coltura e crescita sui diversi *scaffold*, sono stati lavati con PBS e, quindi, incubati per 30 min a 4 °C con acido tricloroacetico (TCA, soluzione al 5% (p/v) in PBS), al fine di lisare le membrane citoplasmatiche ed estrarre le proteine cellulari. Un volume pari a 100 μ l di lisato cellulare è stato, quindi, trasferito in piastre per microtitolazione da 96 pozzetti ed aggiunto di HCl, di o-cresolphthalein complexone (100 μ M) e di 2-amino, 2-methyl, 1-propanolo (0.142 g/ml) fino al volume finale di 300 μ l e pH 10.7. L'intensità del colore è stata misurata alla lunghezza d'onda di 620 nm.

La normalizzazione alla densità cellulare di ogni *scaffold* è stata effettuata misurando la concentrazione proteica nel rispettivo campione con il saggio dell'acido bicincolinico.

3.1.13 Espressione di proteine caratteristiche degli osteoblasti

Il fenotipo osteogenico delle cellule coltivate sui diversi *scaffold* è stato valutato mediante determinazione dei livelli di trascritti mRNA, specifici per geni coinvolti nella differenziazione osteogenica: osteopontina, fosfatasi alcalina (ALP) e sialoproteina ossea (IBS). A tal fine, l'RNA totale è stato estratto dagli osteoblasti, coltivati per 24 h sui diversi *scaffold*, mediante il kit SV Total RNA Isolation System (Promega). Il DNA contaminante è stato rimosso mediante trattamento per 15 min con DNase I. Si sono ottenuti in totale 5 μ g di RNA, che sono stati utilizzati per generare DNA codificante (cDNA), per mezzo di primer ad innesco casuale e dell'enzima del virus della leucemia murina (Mulv, Applied Biosystems). I livelli di trascritti mRNA specifici sono stati determinati mediante reazione di amplificazione real time (rt-PCR), utilizzando il termociclatore ABI Prism 7700 e la miscela di reazione TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), contenente anche primer e sonde specifiche per i geni da determinare.

Per ogni gene, inoltre, una curva standard è stata allestita mediante amplificazione di una quantità nota del corrispondente cDNA, precedentemente clonato nel vettore pGEM-T (Promega). Infine, l'espressione di ogni

gene è stata normalizzata ad un gene endogeno, la gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAD3PH).

La sequenza dei primer usati e le condizioni delle reazioni di amplificazione sono riportate in tabella 3.2.

Gene	Sequenza del primer	Temperatura di amplificazione (°C)
Osteopontina	forward: 5'tttgcagacctgacatcc3'	60
	reverse: 5'ggctgtccaatcagaagg3'	
IBS	forward: 5'caatctgtgccactcactgc3'	60
	reverse: 5'tcattttggtgattgcttcct3'	
ALP	forward: 5'ggcacctgccttactaactcc3'	60
	reverse: 5'cttagccacgttggtgtga3'	
GAD3PH	forward: 5'cgggaagcccatcacca3'	60
	reverse: 5'cggcctcacccatt3'	

Tabella 3.2. Geni e primer utilizzati nella valutazione dell'espressione osteogenica.

3.2 Risultati e discussione

3.2.1 Morfologia degli scaffold elettrofilati

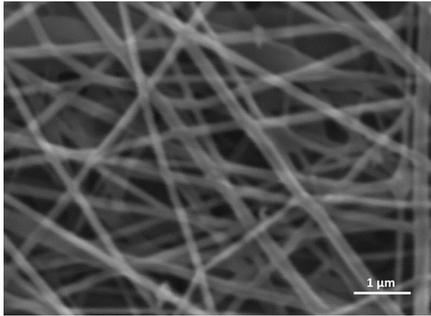
Le immagini al SEM riportano la morfologia delle fibre ottenute per il PCL e per le sei combinazioni di PCL/peptidi (figura 3.0).

Tutte le fibre sono lisce e non presentano gocce. Questo suggerisce che i parametri scelti per l'*electrospinning* (concentrazione della soluzione, tipo di solvente, voltaggio, distanza ago-collettore, velocità di flusso) e mantenuti invariati per tutte le elettrofilature, risultano opportuni. La scelta di queste variabili è stata effettuata sulla base di una ricerca in letteratura e con successive prove di ottimizzazione, eseguite prima sul solo polimero, poi su una soluzione arricchita con uno dei peptidi (PCL/DAK).

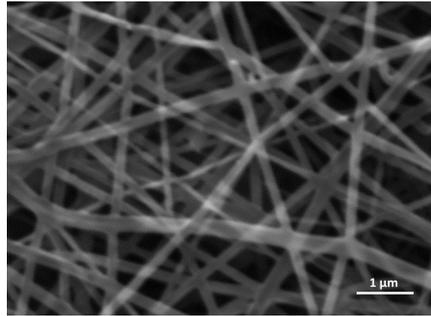
Le fibre sono distribuite randomicamente in tutti i campioni. Le matrici arricchite presentano, a differenza del solo PCL, una tramatura molto più fitta. I diametri variano tra i 100-200 nm in tutti gli *scaffold*: il campione di PCL/RGD-EAK è quello che esibisce, mediamente, le fibre più sottili.

In ogni caso, la distribuzione dei diametri è, per tutti i campioni, all'interno del range della ECM naturale (50-500 nm).

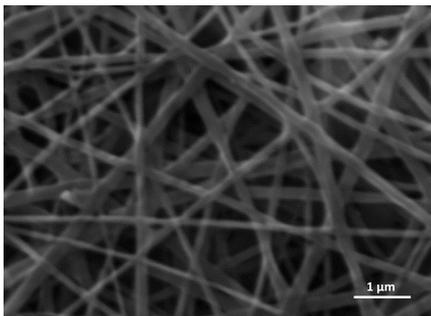
In letteratura si osserva spesso come l'aggiunta di polimeri naturali (collagene, elastina, gelatina) contribuisca alla diminuzione del diametro medio delle nanofibre. Questo avviene in ragione del fatto che i polimeri naturali sono carichi elettricamente e, quindi, in grado di modificare le proprietà dielettriche della soluzione a cui vengono aggiunti.



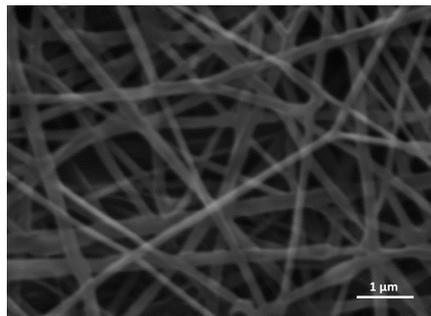
(a) PCL/EAK



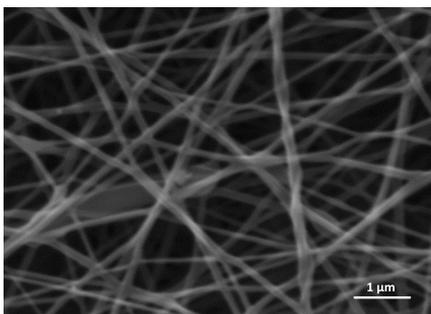
(b) PCL/DAK



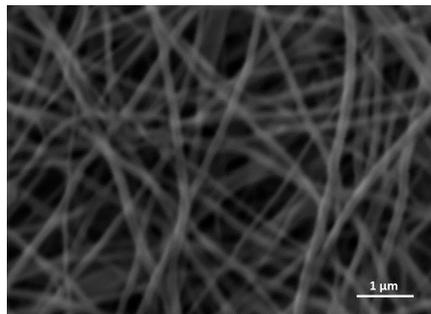
(c) PCL/EAbuK



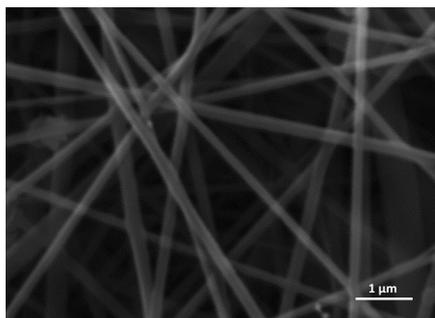
(d) PCL/EYK



(e) PCL/RGD-EAK



(f) PCL/RGD-EAK sc



(g) PCL

Figura 3.0. Immagini al SEM degli *scaffold* elettrofilati in PCL/EAK (a), PCL/DAK (b), PCL/EAbuK (c), PCL/EYK (d), PCL/RGD-EAK (e), PCL/RGD-EAK sc (f) e in PCL (g)

Nel nostro caso, la soluzione elettrofilata è composta al 5% da peptide: è sufficientemente alta da influire sulle sue proprietà chimiche e conformazionali, tuttavia non sembra modificare le proprietà elettriche e viscoelastiche della soluzione. La morfologia, in pratica, non sembra risentirne. Questo è in disaccordo con quanto ottenuto su matrici elettrofilate di polietilenossido (PEO), con peptidi auto-assemblanti (1.3% (wt/wt) di peptide rispetto al PEO). In tal caso, l'aggiunta del peptide produce un assottigliamento delle fibre imputabile alla carica netta positiva della molecola di peptide auto-assemblante che influenza la conducibilità della soluzione da elettrofilare [1]. Va però considerato che, come solvente nelle matrici di PEO è stato utilizzato un tampone salino mentre, nel caso in esame, HFIP.

3.2.2 Spettroscopia infrarossa

Per tutti i campioni investigati, gli spettri FTIR sono stati registrati nel range 1800-1400 cm^{-1} .

In tutti gli spettri si riconosce la tipica banda *stretching* del gruppo carbonilico (C=O) presente nel gruppo estereo del PCL a 1730 cm^{-1} . I rapporti atomici misurati per il polimero sono in buon accordo con quelli teorici. La concordanza rimane tale anche nelle matrici arricchite.

In tutti i campioni ibridi, le bande amide I (1600-1620 cm^{-1}) e amide II (1540 cm^{-1}), caratteristiche del gruppo peptidico, sono ben distinte da quella del PCL.

Per tutti gli spettri IR appartenenti alle matrici arricchite, è stato calcolato il corrispondente rapporto tra le aree dei picchi a 1630 cm^{-1} (β -sheet) e a 1660 cm^{-1} (α -elica o random coil). Il valore risultante fornisce una sti-

ma della percentuale di peptide in conformazione β -sheet o α -elica/random coil. La tabella 3.3, riporta le percentuali misurate.

	EAK	DAK	EAbuK	EYK	RGD-EAK	RGD-EAK sc
β -sheet	89%	85%	90%	88%	57%	70%
α -elica/ random coil	11%	15%	10%	12%	43%	30%

Tabella 3.3. Struttura secondaria dei peptidi all'interno degli *scaffold* elettrofilati: stime percentuali di β -sheet e α -elica/random coil.

All'interno dei rispettivi *scaffold*, l'EAK, il DAK, l'EAbuK e l'EYK mostrano una struttura quasi esclusivamente β -sheet, l'RGD-EAK sc è prevalentemente in α -elica o random coil, come anche l'RGD-EAK. Quest'ultimo, in particolare, presenta una conformazione in disaccordo con quanto riportato negli studi relativi alla sua conformazione sia in soluzione sia in film depositati su oro [43]. In tali studi, infatti, la conformazione prevalente era risultata in β -sheet.

In figura 3.1, sono riportati gli spettri nel range 1850-1500 cm^{-1} . Si vede come la banda amide I si modifica nei diversi *scaffold*: PCL/EAbuK (verde chiaro), PCL/DAK (rosso), PCL/RGD-EAK (blu) e PCL/RGD-EAK sc (verde scuro).

La matrice arricchita con RGD-EAK è stata successivamente trattata con tampone salino, per verificare se vi fossero i gradi di libertà necessari per modificare la struttura secondaria e indurre struttura β -sheet e auto-aggregazione.

Come si evince dai nuovi valori percentuali per l'RGD-EAK, dopo il trattamento con soluzione salina, la percentuale di peptide in conformazione β -sheet aumenta decisamente (75% β -sheet, 25% α -elica/random coil).

La maggior percentuale di β -sheet indica la stabilizzazione indotta dallo ione monovalente positivo della conformazione che permette di ordinare le molecole in strati tramite legami a ponti di H. Tali strati presentano una faccia idrofila e una idrofobica che permette il processo di auto-aggregazione e la formazione, infine, di strutture 3D.

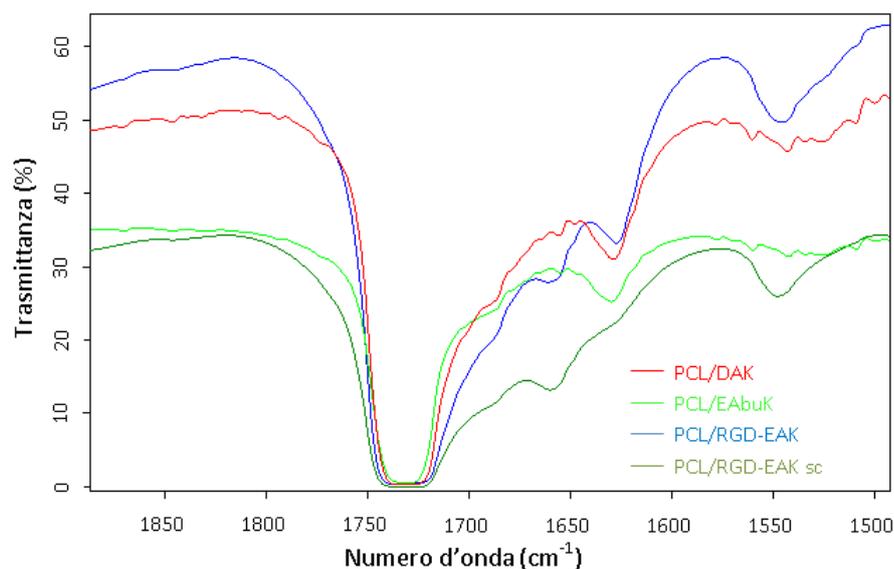


Figura 3.1. Spettri IR dei campioni PCL/EAbuK (verde chiaro), PCL/DAK (rosso), PCL/RGD-EAK (blu) e PCL/RGD-EAK sc (verde scuro).

3.2.3 Calorimetria

Per tutti i campioni sono state misurate la temperatura di transizione vetrosa (T_g), la temperatura di inizio fusione (T_{onset}), la temperatura del picco di fusione (T_{max}) e la percentuale di cristallinità. Quest'ultima è stata ricavata come rapporto ($\chi_c = \Delta H_m / \Delta H_c^0$) tra le variazioni di entalpia di fusione misurata (ΔH_m) e teorica ($\Delta H_c^0 = 81.6$ J/g) del PCL cristallino al 100%. I valori sono relativi a due scansioni.

I dati sulle temperature di transizione vetrosa (tabella 3.4) mostrano, per il PCL, valori in buon accordo con quanto riportato in letteratura. Per i campioni trattati con peptide, invece, T_g non è misurabile durante la prima scansione, mentre nella seconda (dopo una corsa fino a 80 °C) si assesta a ca. -65 °C, valore osservato per il PCL. Tuttavia, la variazione di capacità termica (ΔC_p) è inferiore per i campioni arricchiti con peptide, rispetto al solo PCL.

Per quanto riguarda la T_{onset} , tutti gli *scaffold* in PCL/peptide mostrano valori inferiori al PCL, al contrario di T_{max} , che, invece, è superiore (tabella 3.5).

Campione	T_g scan 1 (°C)	ΔC_p scan 1 (Jg ⁻¹ K ⁻¹)	T_g scan 2 (°C)	ΔC_p scan 2 (Jg ⁻¹ K ⁻¹)
PCL	-63	0.076	-65.3	0.23
PCL/EAK	–	–	-64.3	0.105
PCL/DAK	–	–	-64.5	0.1
PCL/EABuK	–	–	-65.2	0.05
PCL/EYK	–	–	-64.1	0.08
PCL/RGD-EAK	–	–	-64.7	0.154
PCL/RGD-EAK sc	–	–	-66.2	0.132

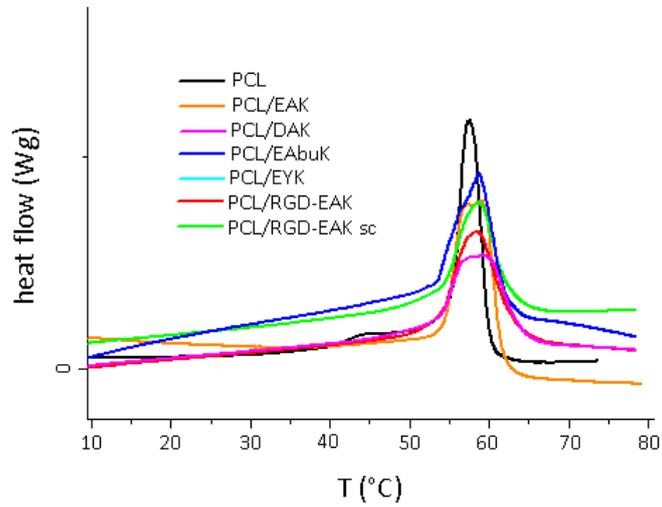
Tabella 3.4. Parametri termici della fase amorfa dei campioni in PCL e in PCL/peptidi auto-assemblanti.

I picchi endotermici di fusione risultano allargati per i campioni contenenti peptidi (figura 3.1); un’analisi mirata alle temperature tra 20 e 80 °C (ad un passo 5 °C/min), ha permesso di chiarire la natura di questi picchi. In realtà, solo il PCL presenta un unico massimo, mentre tutti i campioni arricchiti possiedono picchi multipli (figura 3.1).

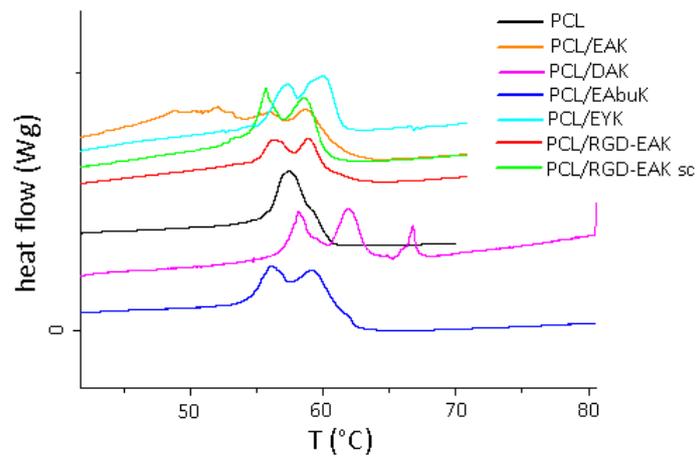
Per quanto riguarda l’organizzazione del materiale nella sua interezza, dai dati ricavati dall’analisi termica si vede che l’aggiunta di peptidi ha l’effetto di indurre una maggiore cristallizzazione. La fase amorfa non solo è più vincolata dalla presenza dei peptidi, ma è anche inferiore rispetto al PCL. Non è irrilevante il fatto che i picchi endotermici delle matrici

Campione	T_{onset} scan 1 (°C)	T_{max} scan 1 (°C)	χ_c scan 1	T_{onset} scan 2 (°C)	T_{max} scan 2 (°C)	χ_c scan 2
PCL	55.2	57.5	0.66	52.1	55.5	0.69
PCL/EAK	54.2	59.0	0.77	52.7	56.4	0.67
PCL/DAK	53.4	59.2	0.58	52.5	57	0.39
PCL/EABuK	53.1	58.8	0.62	52.7	56.2	0.51
PCL/EYK	53.6	59.5	0.52	52.4	56.8	0.45
PCL/RGD-EAK	53.4	58.5	0.65	52.6	56.0	0.72
PCL/RGD-EAK sc	54.0	58.7	0.59	52.7	56.4	0.48

Tabella 3.5. Parametri termici della fase cristallina dei campioni in PCL e in PCL/peptidi auto-assemblanti.



(a) Intervallo di fusione (scan 1, a 20 °C/min)



(b) Intervallo di fusione (scan 1, a 5 °C/min)

Figura 3.2. Zoom nella zona di fusione dei campioni di PCL e PCL/peptidi (scan 1), a due diversi passi di campionamento: 20 °C/min (a) e 5 °C/min (b).

arricchite risultino allargati rispetto a quelli del solo polimero: ciò implica una maggiore distribuzione della fase cristallina. Il PCL/EAK è risultato il campione più cristallino, il PCL/EYK il meno cristallino. L'analisi termica mostra, quindi, l'influenza dei peptidi sulla struttura del PCL, che avviene per mezzo di una forte interazione tra i due componenti: non si tratta, quindi, di una semplice miscela.

3.2.4 Bagnabilità

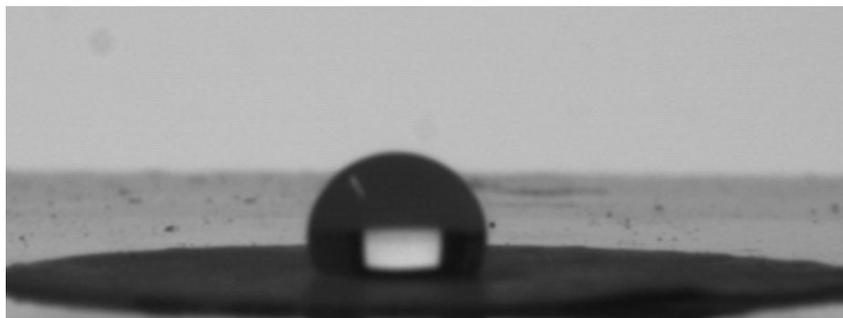
Sui campioni ibridi è stato possibile eseguire una sola misura, a causa del veloce appiattimento della goccia. Gli angoli di contatto sono riportati in tabella 3.6.

PCL	PCL/ EAK	PCL/ DAK	PCL/ EAbuK	PCL/ EYK	PCL/RGD- EAK	PCL/RGD- EAK sc
112.4°	34.3°	57.35°	49.3°	76.5°	70.1°	86.8°
115.9°	spreading forte	spreading molto forte	spreading molto forte	spreading lieve	spreading forte	spreading forte
115.0°	–	–	–	–	–	–

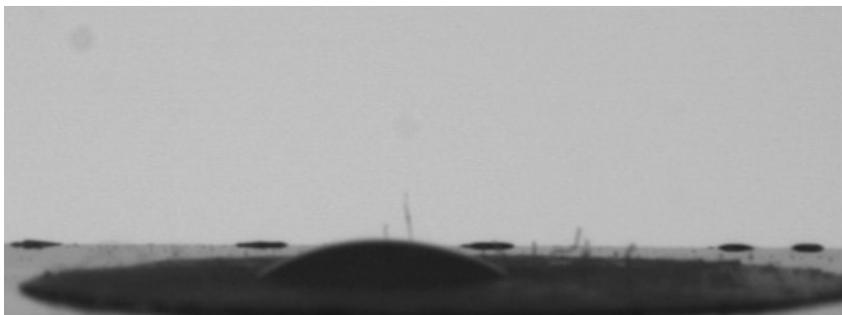
Tabella 3.6. Misure di bagnabilità per le matrici di PCL e di PCL/peptidi.

Le figura 3.1 riporta le immagini della goccia su ogni *scaffold*, che consentono di apprezzare, anche visivamente, il forte *spreading* dato dalle superfici arricchite con peptidi, rispetto al PCL che, al contrario, è fortemente idrofobico ($\theta > 90^\circ$).

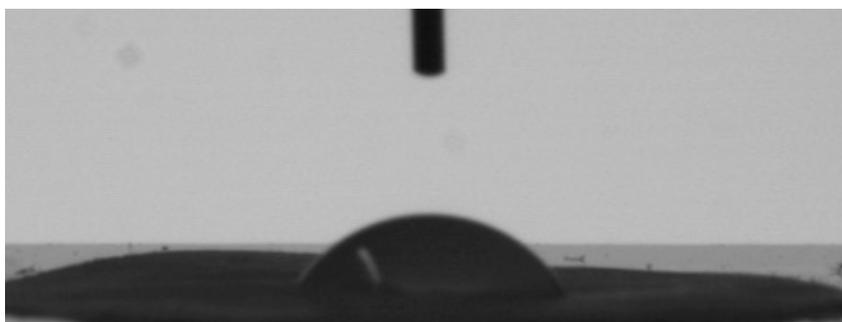
Tutti gli scaffold contenenti peptidi, siano essi auto-assemblanti (ad esempio, EAK, EAbuK, EYK) o meno (RGD-EAK sc), presentano angoli



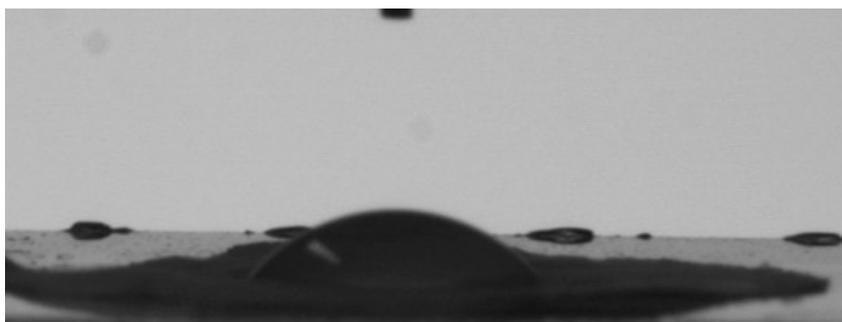
(a) PCL



(b) PCL/EAK



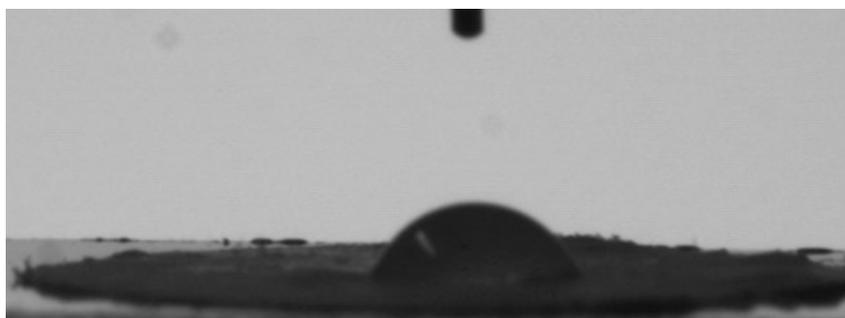
(c) PCL/DAK



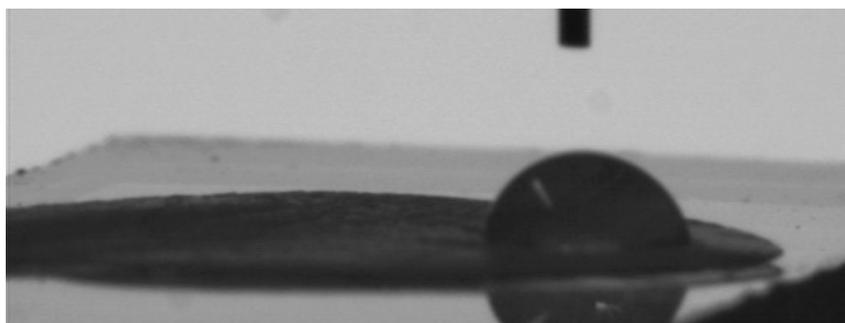
(d) PCL/EAbuK



(e) PCL/EYK



(f) PCL/RGD-EAK



(g) PCL/PCL/RGD-EAK sc

Figura 3.1. Angoli di contatto relativi alle matrici di PCL e di PCL/peptidi.

di contatto $<90^\circ$. In ogni caso si può sottolineare come nel caso di sequenze auto-aggreganti l'idrofilità della superficie risulti maggiore. Le misure dell'angolo di contatto sono interessanti in quanto offrono la possibilità di predire la compatibilità rispetto al sangue e ad altri fluidi biologici dei materiali polimerici [44]. Nel caso in esame percentuali modeste (5%) di peptidi auto-assemblanti modificano la bagnabilità dello *scaffold* polimerico elettrofilato nella direzione di una migliore biocompatibilità.

Nel seguito si riportano gli *scaffold* in ordine decrescente di idrofobicità:

$$\text{PCL} > \text{PCL/RGD-EAK sc} > \text{PCL/EYK} > \text{PCL/RGD-EAK} > \\ \text{PCL/DAK} > \text{PCL/EAbuK} > \text{PCL/EAK}$$

Ulteriori approfondimenti saranno richiesti per valutare come la bagnabilità possa incidere sulla velocità di degradazione.

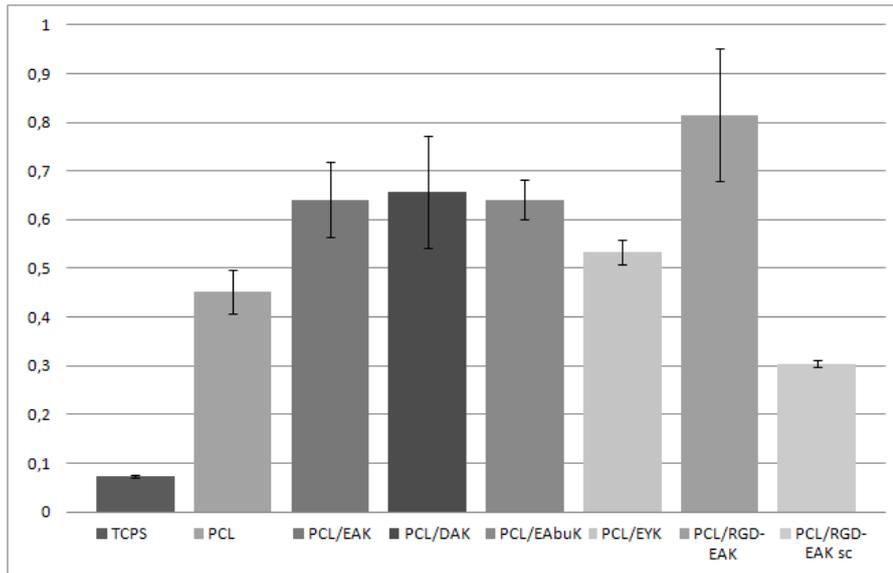
Bisogna considerare che, nel caso di matrici realizzate in nanofibre, l'interfaccia tra goccia e superficie non è esattamente solido/liquido, così come può accadere per un supporto in forma di film. In quest'ultimo, infatti, le interazioni con la fase di gas saranno presumibilmente relegate al profilo tra goccia e superficie, mentre nelle nanofibre la fase di gas permea tutti gli spazi non occupati all'interno delle maglie. Potrebbe essere che l'aria, intrappolata in maggior quantità nel PCL, in quanto filato meno fittamente, incrementi l'idrofobicità naturale del polimero.

3.2.5 Saggio MTT

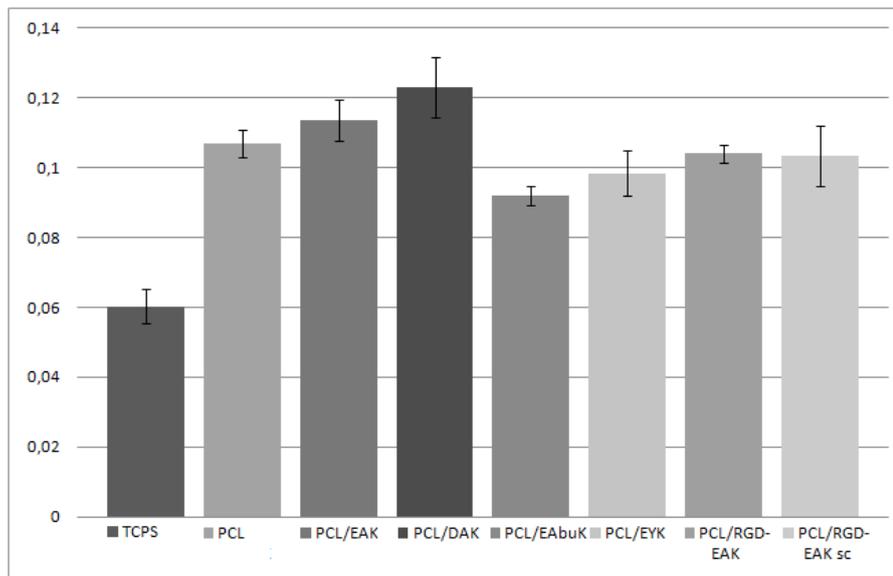
La lettura allo spettrofotometro, ha restituito assorbanze diverse in proporzione alla densità ottica, e, di conseguenza, al numero di cellule, che hanno aderito a ciascuno *scaffold*. I risultati sono riportati in forma di istogramma (figura 3.2).

Tutti le matrici arricchite con peptidi dimostrano di incrementare l'adesione da parte degli osteoblasti, eccezion fatta per l'RGD-EAK scrambled. Il peptide che fornisce, invece, i migliori risultati in termine di adesione è l'RGD-EAK. L'aggiunta della sequenza RGD, non spiegherebbe, quindi, da sola l'adesione cellulare. Dai risultati ottenuti sembra, infatti, giocare un ruolo fondamentale anche l'auto-aggregazione che permette di ottenere strutture tridimensionali.

Anche il PCL migliora l'adesione rispetto al polistirene per colture tessutali (TCPS). Questo fatto ribadisce, evidentemente, che la presenza di una struttura articolata simile alla naturale ECM, induce un'adesione più pronta rispetto a supporti di polistirene, in ogni caso trattati per ottimizzare l'adesione cellulare.



(a) Prova di adesione immediatamente seguente all'elettrofilatura



(b) Prova di adesione a distanza di 5 mesi dall'elettrofilatura

Figura 3.2. Istogrammi dei livelli di adesione alle matrici: subito dopo (a) e a distanza di 5 mesi (b) dall'elettrofilatura.

Lo stesso esperimento è stato eseguito sugli *scaffold* elettrofilati a 5 mesi di distanza (i campioni sono stati tenuti in frigorifero tra un esperimento e l'altro).

Come si vede chiaramente dai dati riportati, l'adesione risulta molto diminuita in termini di numero di cellule presenti (i valori di assorbanza sono addirittura 10 volte inferiori rispetto a quelli del saggio eseguito immediatamente dopo la fabbricazione dei supporti).

Sembrerebbe, quindi, che il polimero vada incontro ad una modificazione precoce, non risultando più, di conseguenza, adeguato a favorire la crescita cellulare. Essendo i peptidi, come visto dagli spettri IR e dalle prove DSC, intimamente legati al PCL, un eventuale cedimento della struttura del polimero potrebbe portare a vanificare l'apporto delle proprietà osteo-induttive dei peptidi stessi. Questo spiegherebbe il profilo di adesione uguale per tutte le matrici elettrofilate, indipendentemente dalla presenza o meno dell'arricchimento peptidico.

I dati di adesione verranno prossimamente confermati mediante la ripetizione dell'esperimento con *scaffold* elettrofilati di nuova produzione. I dati preliminari sembrano indicare che le sequenze che auto-assemblano promuovono l'adesione rispetto al solo PCL e alla matrice polimerica che contiene un peptide che non auto aggrega anche se contiene una sequenza pro-adesiva. Un caso particolare è quello del peptide DAK che, in soluzione acquosa sembra preferire la struttura α -elicoidale a quella β -sheet che è alla base della formazione di struttura 3D gradite alle cellule: studi recenti e i dati qui riportati di assorbimento IR hanno permesso di constatare come anche questa sequenza depositata su superfici e, quindi allo stato solido, assuma conformazioni di tipo β e ciò consente di affermare che tutte le sequenze auto-assemblanti promuovono l'adesione di osteoblasti umani, negli esperimenti qui proposti. I dati risultano significativi rispetto al riferimento RGD-EAK sc ovvero a una matrice arricchita con un peptide che non auto-aggrega.

3.2.6 Livelli di calcio

Anche il calcio (figura 3.3) sembra confermare i risultati ottenuti con le prove di adesione. Spicca tra gli altri il peptide EAbuK, che dimostra di favorire notevolmente la mineralizzazione della matrice. Questo fatto potrebbe essere dovuto al tipo di struttura offerta da questo peptide in soluzione: esso forma infatti strutture particolarmente stabili, in grado di promuovere la struttura 3D. In generale, tutti i peptidi aumentano la capacità mineralizzatrice dello *scaffold*: come prima, soltanto l'RGD-EAK sc mostra risultati del tutto simili a quelli del PCL privo di arricchimento.

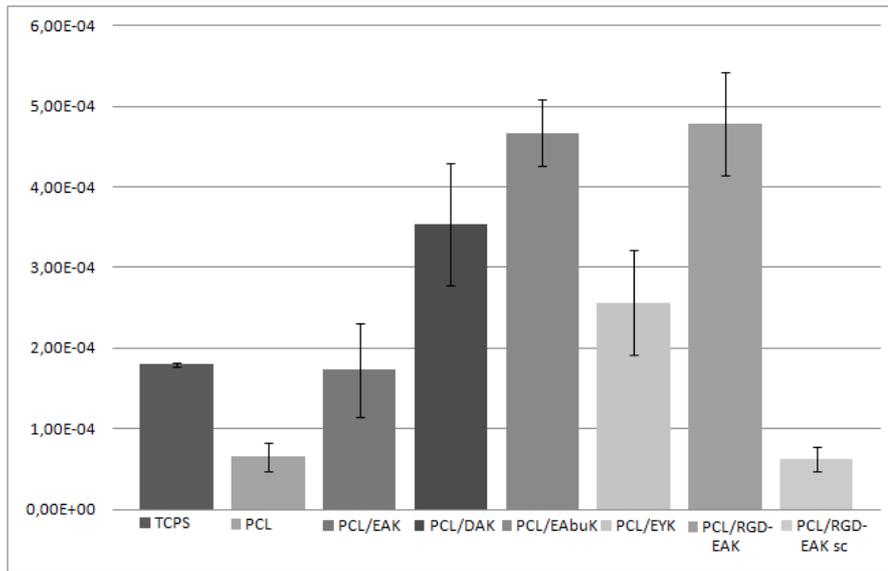


Figura 3.3. Istogramma dei livelli di calcio

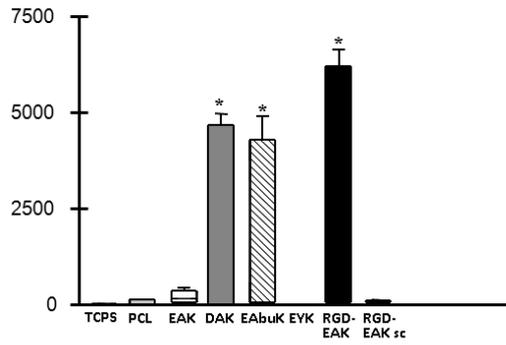
Anche in questo caso, è possibile affermare che la sola presenza di motivi di adesione non spieghi un'aumento della capacità proliferativa e di mineralizzazione da parte degli osteoblasti.

3.2.7 Espressione di ALP, osteopontina e IBS

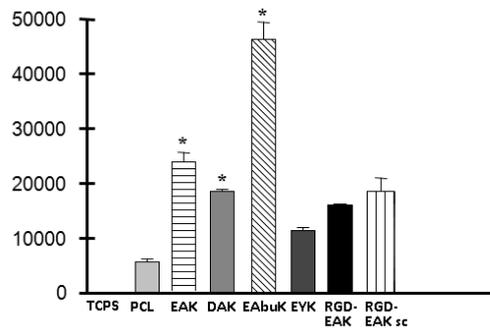
I risultati sull'espressione genica mostrano che il peptide che, costantemente, sembra promuovere di più la mineralizzazione è, di nuovo, l'EAbuK. Tuttavia i risultati variano al variare della sequenza genica considerata, in relazione, quindi, al tipo di proteina espressa (nonostante tutte i tre geni considerati siano conosciuto per l'azione nella regolazione della componente minerale del tessuto osseo).

I dati riportati in figura 3.4 indicano che l'espressione del gene per l'osteopontina viene notevolmente incrementata per le matrici contenenti DAK, RGD-EAK e EAbuK, tre peptidi in grado di auto-assemblare. I dati risultano significativi rispetto al solo PCL. Il peptide RGD-EAK sc che non auto-assembla non dà alcun affetto.

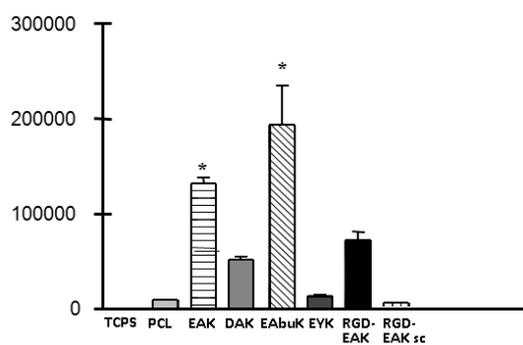
I dati riportati in figura 3.4 indicano come molte delle sequenze utilizzate risultano incrementare l'espressione del gene della fosfatasi alcalina. Si tratta di un enzima non specifico per l'osso e comune ad altri tessuti, che



(a) Osteopontina



(b) ALP



(c) IBS

Figura 3.4. Istogrammi dei livelli di espressione di proteine caratteristiche degli osteoblasti: osteopontina (a), ALP (b) e IBS (c).

idrolizza i depositi di fosfato formati nelle cellule, li mobilita e promuove la mineralizzazione. Una maggiore espressione di ALP dovrebbe essere correlata ad una maggior produzione di calcio e questo appare confermato per gli altri *scaffold* contenenti DAK e EAbuK.

In disaccordo con quanto detto il dato relativo a RGD-EAK che aumenta la produzione di Ca ma non in modo significativo l'espressione di ALP.

In figura 3.4 vengono riportati i dati relativi all'espressione genica di sialoproteina ossea registrati per i vari campioni. L'incremento significativo di espressione riguarda EAK e EAbuK mentre l'aumento di espressione di DAK e RGD-EAK non risulta in questo esperimento essere significativa.

In conclusione, si riporta in tabella 3.7 un diagramma riassuntivo sui principali risultati ottenuti, nelle varie prove, da tutti gli *scaffold* elettrofilati.

Campione	Angolo di contatto ^a	Adesione	Ca	Osteo-pontina	ALP	IBS
PCL	–	– ^b	– ^c		+	
PCL/EAK	++	++	+ ^d	+	+++	++
PCL/DAK	++	++	++	++	+++	+
PCL/EAbuK	++	++	+++	++	++++	+++
PCL/EYK	+	+	++		++	
PCL/RGD-EAK	+	+++	+++	+++	++	+
PCL/RGD-EAK sc	+	-- ^e	-- ^f		++	

^a idrofilico

^b più del polistirene

^c meno del polistirene

^d come il polistirene

^e meno del PCL

^f meno del PCL e del polistirene

Tabella 3.7. Tabella comparativa-riassuntiva dei dati relativi alla bagnabilità e ai saggi biologici.

Capitolo 4

Conclusioni

Il presente lavoro di tesi ha riguardato lo studio di *scaffold* elettrofilati ibridi con una componente polimerica (PCL) e una componente biomimetica di natura peptidica (peptidi auto-assemblanti).

La caratterizzazione delle matrici è stata fatta mediante indagini SEM, FTIR, di calorimetria differenziale e valutazione della bagnabilità.

Si sono evidenziate in tal modo gli aspetti interessanti quali un aumento significativo della bagnabilità con acqua dello *scaffold* arricchito e una maggior cristallinità del materiale di nuova formulazione oltre alla possibilità di incrementare la conformazione che media l'ottenimento di *scaffold* 3D per pre-trattamento delle matrici arricchite con i peptidi con una soluzione salina.

I saggi biologici indicano che mediamente le cellule gradiscono la presenza di peptidi auto-assemblanti rispetto al solo PCL o all'arricchimento dello stesso con un peptide (RGD-EAK sc) che non forma strutture 3D.

Vi sono differenze significative all'interno dei peptidi auto-assemblanti che possiamo così riassumere:

- EAbuK risulta incrementare l'adesione cellulare, il deposito di calcio a 7 gg e induce un'espressione genica maggiore sia del gene dell'osteopontina che di quelli ALP e IBS. Il peptide EAbuK rispetto agli altri è in grado di formare strutture β -sheet particolarmente stabili per incremento dell'idrofobicità del residuo Abu rispetto ad Ala;
- promettenti risultano anche i dati della matrice che contiene il peptide RGD-EAK. In questo caso si ha un incremento marcato di adesione cellulare che può essere dovuto alla cooperazione tra motivo RGD e struttura 3D, un incremento di deposito di calcio e un'espressione genica marcata di osteopontina, a fronte di una meno incisiva induzione di IBS e di ALP. Se confrontiamo i dati con quelli ottenuti

per EAK si può pensare che nel caso del peptide RGD-EAK vi possa essere una sorta di cooperazione tra il motivo adesivo e la sequenza auto-assemblante con un esito positivo. Il solo motivo RGD inserito in una sequenza conformazionalmente incapace di formare strutture 3D (RGD-EAK sc) incide solamente nell'espressione genica di ALP;

- il peptide DAK sembra incrementare l'adesione, la produzione di calcio e l'espressione genica di osteopontina e ALP (meno quella di IBS);
- la sequenza EAK, pur incrementando l'adesione e l'espressione di ALP e IBS, produce poco deposito di calcio e poco incremento dell'espressione genica di osteopontina, la quale, comunque, risulta essere un marcatore essenziale del processo di ossificazione.

Dai risultati ottenuti, che si dimostrano promettenti, si può pensare di poter applicare questi materiali in svariati campi della medicina rigenerativa: per esempio, nella copertura di superfici implantari, per aumentarne le proprietà biomimetiche, applicazioni non solo *in vitro*, ma anche *in vivo*.

Sono in programma studi ulteriori di caratterizzazione meccanica (rigidezza, tensione ed eventuali sforzi viscosi), come successivo approfondimento delle proprietà meccaniche e strutturali delle matrici elettrofilate (risultati già parzialmente deducibili dal grado di cristallinità rilevato con l'indagine DSC).

In ogni caso, i risultati finora ottenuti attestano che le matrici elettrofilate di peptidi auto-assemblanti possono essere utilizzate con successo nell'Ingegneria tessutale.

Bibliografia

- [1] J.P. Bilezikian, L.G. Raisz, T.J. Martin, *Principles of bone biology*. Elsevier, 2008.
- [2] S. Zhang, T. Holmes, C. Lockshin, A. Rich, “Spontaneous assembly of a self-complementary oligopeptide to form a stable macroscopic membrane,” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 90, pp. 3334–3338, 1993.
- [3] S. Zhang, “Emerging biological materials through molecular self-assembly,” *Biotech. Adv.*, vol. 20, pp. 321–339, 2002.
- [4] H. Yoshimoto, Y.M. Shin, H. Terai, J.P. Vacanti, “A biodegradable nanofiber scaffold by electrospinning and its potential for bone tissue engineering,” *Biomaterials*, vol. 24, pp. 2077–2082, 2003.
- [5] A.S. Badami, M.R. Kreke, M.S. Thompson, J.S. Riffle, A.S. Goldstein, “Effect of fiber diameter on spreading, proliferation, and differentiation of osteoblastic cells on electrospun poly(lactic acid) substrates,” *Biomaterials*, vol. 27, pp. 596–606, 2006.
- [6] A.S. Badami, M.R. Kreke, M.S. Thompson, J.S. Riffle, A.S. Goldstein, “Bone scaffolds from electrospun fiber mats of poly(3-hydroxybutyrate), poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and their blend,” *Polymer*, vol. 48, pp. 1419–1427, 2007.
- [7] Y. Zhang, H. Ouyang, C.T. Lim, S. Ramakrishna, Z.M. Huang, “Electrospinning of gelatin fibers and gelatin/PCL composite fibrous scaffolds,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 72B, pp. 156–165, 2005.
- [8] H.W. Kim, H.S. Yu, H.H. Lee, “Nanofibrous matrices of poly(lactic acid) and gelatin polymeric blends for the improvement of cellular responses,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 87A, pp. 25–32, 2008.

- [9] D.I. Zeugolis, S.T. Khew, E.S.Y. Yew, A.K. Ekaputra, Y.W. Tong, L.L. Yung, D.W. Hutmacher, C. Sheppard, M. Raghunath, "Electrospinning of pure collagen nano-fibres - Just an expensive way to make gelatin?," *Biomaterials*, vol. 29, pp. 2293–2305, 2008.
- [10] H.J. Jin, J. Chen, V. Karageorgiou, G.H. Altman, D.L. Kaplan, "Human bone marrow stromal cell responses on electrospun silk fibroin mats," *Biomaterials*, vol. 25, pp. 1039–1047, 2004.
- [11] C. Li, H.J. Jin, G.D. Botsaris, D.L. Kaplan, "Silk apatite composites from electrospun fibers," *J. Mater. Res.*, vol. 20, pp. 3374–3384, 2005.
- [12] S.Y. Shin, H.N. Park, K.H. Kim, M.H. Lee, Y.S. Choi, Y.J. Park, Y.M. Lee, Y. Ku, I.C. Rhyu, S.B. Han, S.J. Lee, C.P. Chung, "Biological evaluation of chitosan nanofiber membrane for guided bone regeneration," *J. Periodontol.*, vol. 76, pp. 1778–1784, 2005.
- [13] H.W. Kim, H.E. Kim, J.C. Knowles, "Production and potential of bioactive glass nanofibers as a next-generation biomaterial," *Adv. Funct. Mater.*, vol. 16, pp. 1529–1535, 2006.
- [14] H.W. Kim, H.E. Kim, "Nanofiber generation of hydroxyapatite and fluor-hydroxyapatite bioceramics," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 77B, pp. 323–328, 2006.
- [15] Y. Wu, L.L. Hench, "Preparation of hydroxyapatite fibers by electrospinning technique," *J. Am. Ceram. Soc.*, vol. 87, pp. 1988–1991, 2004.
- [16] X. Dai, S. Shivkumar, "Electrospinning of PVA-calcium phosphate sol precursors for the production of fibrous hydroxyapatite," *J. Am. Ceram. Soc.*, vol. 90, pp. 1412–1419, 2007.
- [17] S. Sakai, Y. Yamada, T. Yamaguchi, K. Kawakami, "Prospective use of electrospun ultra-fine silicate fibers for bone tissue engineering," *Biotechnol. J.*, vol. 1, pp. 958–962, 2006.
- [18] H.W. Kim, J.H. Song, H.E. Kim, "Nanofiber generation of gelatin-hydroxyapatite biomimetics for guided tissue regeneration," *Adv. Funct. Mater.*, vol. 15, pp. 1988–1994, 2005.
- [19] J.H. Song, H.E. Kim, H.W. Kim, "Electrospun fibrous web of collagen-apatite precipitated nanocomposite for bone regeneration," *J. Mater. Sci., Mater. Med.*, vol. 19, pp. 2925–2932, 2008.

- [20] Y. Zhang, J.R. Venugopal, A. El-Turki, S. Ramakrishna, B. Su, C.T. Lim, "Electrospun biomimetic nanocomposite nanofibers of hydroxyapatite/chitosan for bone tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 29, pp. 4314–4322, 2008.
- [21] K. Fujihara, M. Kotakib, S. Ramakrishna, "Guided bone regeneration membrane made of polycaprolactone/calcium carbonate composite nano-fibers," *Biomaterials*, vol. 26, pp. 4139–4147, 2005.
- [22] H.W. Kim, H.H. Lee, J.C. Knowles, "Electrospinning biomedical nanocomposite fibers of hydroxyapatite/poly(lactic acid) for bone regeneration," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 79A, pp. 643–649, 2006.
- [23] J.H. Song, B.H. Yoon, H.E. Kim, H.W. Kim, "Bioactive and degradable hybridized nanofibers of gelatin-siloxane for bone regeneration," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 84A, pp. 875–884, 2008.
- [24] K. Ma, C.K. Chan, S. Liao, W.Y.K. Hwang, Q. Feng, S. Ramakrishna, "Electrospun nanofiber scaffolds for rapid and rich capture of bone marrow-derived hematopoietic stem cells," *Biomaterials*, vol. 29, pp. 2096–2103, 2008.
- [25] H.S. Yu, J.H. Jang, T.I. Kim, H.H. Lee, H.W. Kim, "Apatite-mineralized polycaprolactone nanofibrous web as a bone tissue regeneration substrate," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 88A, pp. 747–754, 2009.
- [26] T.G. Kim, T.G. Park, "Biomimicking extracellular matrix: cell adhesive RGD peptide modified electrospun poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) nanofiber mesh," *Tissue Eng.*, vol. 12, pp. 221–233, 2006.
- [27] J.E. Kim, K.T. Noh, H.S. Yu, H.Y. Lee, J.H. Jang, H.W. Kim, "A fibronectin peptide-coupled biopolymer nanofibrous matrix to speed up initial cellular events," *Adv. Eng. Mater.*, vol. 12B, pp. 94–100, 2010.
- [28] C. Lia, C. Veparia, H.J. Jina, H.J. Kima, D.L. Kaplan, "Electrospun silk-BMP-2 scaffolds for bone tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 27, pp. 3115–3124, 2006.
- [29] H. Nie, C.H. Wang, "Fabrication and characterization of PLGA/HAP composite scaffolds for delivery of BMP-2 plasmid DNA," *J. Control. Release*, vol. 120, pp. 111–121, 2007.

- [30] E. Garreta, E. Genové, S. Borrós, C.E. Semino, “Osteogenic differentiation of mouse embryonic stem cells and mouse embryonic fibroblasts in a three-dimensional self-assembling peptide scaffold,” *Tissue Eng.*, vol. 12, pp. 2215–2227, 2006.
- [31] K. Hamada, M. Hirose, T. Yamashita, H. Ohgushi, “Spatial distribution of mineralized bone matrix produced by marrow mesenchymal stem cells in self-assembling peptide hydrogel scaffold,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 84A, pp. 128–136, 2008.
- [32] H. Hosseinkhania, M. Hosseinkhanib, F. Tianc, H. Kobayashic, Y. Tabata, “Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in self-assembled peptide-amphiphile nanofibers,” *Biomaterials*, vol. 27, pp. 4079–4086, 2006.
- [33] F. Zhang, G.S. Shi, L.F. Ren, F.Q. Hu, S.L. Li, Z.J. Xie, “Designer self-assembling peptide scaffold stimulates pre-osteoblast attachment, spreading and proliferation,” *J. Mater. Sci., Mater. Med.*, vol. 20, pp. 1475–1481, 2009.
- [34] A. Horii, X. Wang, F. Gelain, S. Zhang, “Biological designer self-assembling peptide nanofiber scaffolds significantly enhance osteoblast proliferation, differentiation and 3-D migration,” *PLoS ONE*, vol. 2, pp. 190–199, 2007.
- [35] H. Misawa, N. Kobayashi, A. Soto-Gutierrez, Y. Chen, A. Yoshida, J.D. Rivas-Carrillo, N. Navarro-Alvarez, K. Tanaka, A. Miki, J. Takei, T. Ueda, M. Tanaka, H. Endo, N. Tanaka, T. Ozaki, “PuraMatrixTM facilitates bone regeneration in bone defects of calvaria in mice,” *Cell Transplant.*, vol. 15, pp. 903–910, 2006.
- [36] G. HE, T. Dahl, A. Veis, A. George, “Nucleation of apatite crystals in vitro by self-assembled dentin matrix protein 1,” *Nat. Mater.*, vol. 2, pp. 552–558, 2003.
- [37] J.D. Hartgerink, E. Beniash, S.I. Stupp, “Self-assembly and mineralization of peptide-amphiphile nanofibers,” *Science*, vol. 294, pp. 1684–1688, 2001.
- [38] A. Mata, Y. Geng, K.J. Henrikson, C. Aparicio, S.R. Stock, R.L. Satcher, S.I. Stupp, “Bone regeneration mediated by biomimetic mineralization of a nanofiber matrix,” *Biomaterials*, vol. 31, pp. 6004–6012, 2010.

- [39] E. Garreta, D. Gasset, C. Semino, S. Borròs, “Fabrication of a three-dimensional nanostructured biomaterial for tissue engineering of bone,” *Biomol. Eng.*, vol. 24, pp. 75–80, 2007.
- [40] A. Tambralli, B. Blakeney, J. Anderson, M. Kushwaha, A. Andukuri, D. Dean, H.W. Jun, “A hybrid biomimetic scaffold composed of electrospun polycaprolactone nanofibers and self-assembled peptide amphiphile nanofibers,” *Biofabrication*, vol. 1, pp. 1–11, 2009.
- [41] R. Egerton, *Physical principles of electron microscopy: an introduction to TEM, SEM, and AEM*. Springer, 2006.
- [42] R. Gambaretto, L. Tonin, C. Di Bello, M. Dettin, “Self-assembling peptides: sequence, secondary structure in solution and film formation,” *Biopolymers*, vol. 89, pp. 906–915, 2008.
- [43] G. Iucci, C. Battocchio, M. Dettin, R. Gambaretto, G. Polzonetti, “A NEXAFS and XPS study of the adsorption of self-assembling peptides on TiO₂: the influence of the side chains,” *Surf. Interface Anal.*, vol. 40, pp. 210–214, 2008.
- [44] Y.G. Bogdanova, V.D. Dolzhikova, G.P. Belov, O.N. Golodkov, A.E. Chalykh, “Prediction of biocompatibility of olefin-carbon monoxide alternating copolymers from their surface energy parameters,” *Moscow Univ. Chem. Bull.*, vol. 63, pp. 265–268, 2008.

Elenco delle tabelle

1.1	Brevetti sull' <i>electrospinning</i>	6
1.2	Proprietà termiche e meccaniche del PCL	12
2.1	Regioni dello spettro IR	27
3.1	Peptidi auto-assemblanti	34
3.2	Geni e sequenze dei primer	39
3.3	Struttura secondaria dei peptidi elettrofilati	42
3.4	Fase amorfa dei campioni: parametri termici	44
3.5	Fase cristallina dei campioni: parametri termici	44
3.6	Misura di bagnabilità dei campioni	46
3.7	Riassunto dei risultati	54

Elenco delle figure

1.1	Schema dell' <i>electrospinning</i>	8
1.2	Schema dell'auto-assemblamento del peptide EAK	10
1.3	Struttura del PCL	13
2.1	Schema di un SEM	24
2.2	Schema di un FTIR	26
2.3	Misura dell'angolo di contatto	29
3.0	Immagini al SEM delle matrici elettofilate	41
3.1	Spettri IR dei peptidi	43
3.2	Misura calorimetrica dei campioni: temperatura di fusione	45
3.1	Immagini degli angoli di contatto dei campioni	48
3.2	Istogrammi dei livelli di adesione	50
3.3	Istogramma dei livelli di calcio	52
3.4	Istogrammi di espressione genica	53