



**UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA**



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

**NEUROGUIDE A BASE DI POLIMERI CONDUTTORI PER LA  
RIGENERAZIONE DEI NERVI PERIFERICI**

**Relatore: Prof. Silvia Todros**

**Laureando: Federico Manelli**

**ANNO ACCADEMICO 2022 – 2023**

**Data di laurea 27/09/2023**



## INDICE

<b>ABSTRACT.....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUZIONE.....</b>	<b>3</b>
<b>1. IL SISTEMA NERVOSO.....</b>	<b>5</b>
<b>1.1 organizzazione del sistema nervoso.....</b>	<b>5</b>
1.1.1 sistema nervoso centrale .....	5
1.1.2 sistema nervoso periferico .....	5
<b>1.2 cellule del sistema nervoso.....</b>	<b>6</b>
1.2.1 neuroni .....	6
1.2.2 cellule gliali.....	8
<b>1.3 struttura dei nervi.....</b>	<b>9</b>
<b>1.4 potenziale di membrana e potenziale d'azione.....</b>	<b>10</b>
1.4.1 potenziale di membrana.....	10
1.4.2 potenziale d'azione .....	11
<b>2. LESIONI DEI NERVI.....</b>	<b>13</b>
<b>2.1 classificazione delle lesioni ai nervi.....</b>	<b>13</b>
<b>2.2 fisiopatologia e rigenerazione della lesione nervosa.....</b>	<b>15</b>
<b>2.3 trattamenti clinici.....</b>	<b>17</b>
2.3.1 trattamenti non chirurgici.....	18
2.3.1.1 trattamenti farmacologici.....	18
2.3.1.2 Stimolazione elettrica.....	18
2.3.2 trattamenti chirurgici.....	23
<b>3. NEUROGUIDE.....</b>	<b>29</b>
<b>3.1 ingegneria tissutale .....</b>	<b>29</b>
<b>3.2 Neuroguide .....</b>	<b>31</b>
3.2.1 Proprietà .....	32
3.2.2 Design .....	34
3.2.3 Materiali .....	36
3.2.3.1 biomateriali naturali.....	37
3.2.3.2 biomateriali sintetici .....	42
<b>4. NEUROGUIDE A BASE DI MATERIALI CONDUTTORI.....</b>	<b>47</b>
<b>4.1 biomateriali conduttivi.....</b>	<b>48</b>
<b>4.2 Polimeri conduttori.....</b>	<b>49</b>
4.2.1 Meccanismo di conduzione.....	49
4.2.2 Proprietà.....	51
4.2.3 Materiali .....	52
4.2.3.1 Polipirrolo (PPY).....	52
4.2.3.2 polianilina (PANI) .....	55
4.2.3.3 poli(3,4 etilenediossiofene) (PEDOT).....	56
4.2.3.4 prospettive future.....	60
<b>5. CONCLUSIONE .....</b>	<b>61</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>63</b>



## **ABSTRACT**

Le lesioni ai nervi periferici (PNI), spesso causate da incidenti o traumi, possono avere gravi conseguenze sulla qualità di vita dei soggetti colpiti.

L'innesto nervoso autologo è il trattamento *gold standard* nel caso delle lesioni più gravi, ma porta con sé limitazioni come la scarsa disponibilità di tessuto e la perdita di sensibilità nel sito donatore.

La tubulizzazione mediante neuroguide (NGC) si è mostrata un'alternativa promettente per superare le problematiche legate alle principali tecniche microchirurgiche per il trattamento delle PNI. I condotti nervosi offrono supporto meccanico, protezione e possono essere funzionalizzate o riempite mediante molecole bioattive capaci di promuovere la rigenerazione del nervo lesionato.

Un nuovo approccio combina l'utilizzo di NGC con la stimolazione elettrica a bassa frequenza, ma in questo caso è necessario che i condotti siano in grado di condurre questi stimoli elettrici. Possono essere utilizzati stimolatori elettrici impiantabili e biodegradabili che consentono la stimolazione post-operatoria senza interventi di rimozione dei dispositivi.

In questa tesi verranno approfonditi *design*, proprietà e materiali dei condotti nervosi, concentrandosi principalmente su polimeri conduttivi, come polipirrolo, polianilina, e poli(3,4-etilenediossiofene), che presentano proprietà tipiche dei polimeri comuni, ma anche la capacità di condurre elettricità grazie alla loro particolare struttura molecolare.



## INTRODUZIONE

Il sistema nervoso è un sistema altamente specializzato nella trasmissione ed elaborazione di informazioni attraverso il corpo. Una sua lesione, dunque, porta inevitabilmente a conseguenze da non sottovalutare.

Le lesioni ai nervi periferici (PNI) sono una problematica con un'elevata incidenza nel mondo e si possono verificare in seguito ad incidenti, traumi e altre cause, con conseguenti implicazioni sulla qualità di vita del soggetto. Infatti, una lesione al nervo può influenzare negativamente la comunicazione tra cervello organi e muscoli, e portare, dunque, ad una disabilità permanente del soggetto attraverso la perdita di funzioni sensoriali e motorie.

Attualmente la tecnica *gold standard* nel trattamento delle lesioni più gravi è l'innesto nervoso autologo, ma ad esso ci sono svantaggi associati come la limitata disponibilità di tessuto, la perdita di sensibilità e di funzione del sito donatore e interventi chirurgici secondari. Per superare queste problematiche si fa spesso ricorso agli alloinnesti, ma ciò comporta la necessità di terapie immunosoppressive per evitare il rigetto dell'innesto. In letteratura sono evidenziate anche altre tecniche alternative per il trattamento delle PNI come la riparazione diretta *end-to-end* o trasferimenti nervosi, ma questi vengono utilizzati solo in casi particolari e ben specifici. Vantaggi e svantaggi di queste modalità vengono presentati nel corso di questa tesi.

Le principali problematiche legate all'utilizzo di queste tecniche microchirurgiche tradizionali per la riparazione delle PNI hanno portato la comunità scientifica a cercare nuove strategie.

La "tubulizzazione" mediante condotti di guida nervosi (NGC) si è dimostrata fin dai primi tentativi un'ottima alternativa all'innesto autologo. Questa tecnica consiste nell'impegno di strutture cilindriche, tubulari, biocompatibili e di varia natura che vengono posizionate tra i due monconi di un nervo reciso all'interno dei quali il nervo rigenerante può trovare protezione, supporto meccanico ed orientamento. Inoltre, le NGC possono essere funzionalizzate attraverso l'incorporazione di molecole bioattive o riempite con specifici materiali in grado di promuovere ulteriormente la ricrescita nervosa.

In generale, oltre all'ottima biocompatibilità, un buon condotto nervoso deve presentare proprietà adeguate come porosità, biodegradabilità, la rigidità/flessibilità e la capacità di sutura. Recentemente è emerso un nuovo approccio per la gestione delle PNI che consta nell'utilizzo combinato di condotti nervosi conduttivi e stimolazione elettrica a bassa frequenza. In questo modo è possibile affrontare la perdita della trasmissione dell'impulso nervoso in seguito alla lesione, ma anche fornire segnali elettrici fortemente localizzati ai nervi rigeneranti.

Molti studi, infatti, hanno dimostrato il ruolo della stimolazione elettrica nel promuovere la rigenerazione delle cellule nervose, ma in realtà, il meccanismo esatto alla base è ancora sotto inchiesta.

Sfruttando i progressi nella ricerca biomateriali, sono state proposti degli stimolatori elettrici wireless completamente impiantabili e biodegradabili in modo poter applicare la stimolazione elettrica anche nel periodo post-operatorio senza la necessità di un intervento di rimozione del dispositivo.

NGC conduttive possono essere fabbricate utilizzando materiali a base di carbonio, nanoparticelle di oro o argento e polimeri conduttori.

I polimeri intrinsecamente conduttori come il poli-3,4-elendiossitiotene (PEDOT), il polipirrolo e la polianilina si sono mostrati interessanti nella fabbricazione di condotti conduttivi. Infatti, presentano proprietà tipiche dei polimeri comuni come flessibilità e bassa rigidità e, grazie alla loro particolare struttura molecolare sono in grado di condurre corrente elettrica.

Tuttavia, la loro scarsa degradabilità ha spinto la comunità scientifica a continuare la ricerca di materiali più innovativi.



# 1. IL SISTEMA NERVOSO

## 1.1 Organizzazione del sistema nervoso

Per sistema nervoso si intende l'insieme di organi specializzati nelle funzioni di ricezione, elaborazione e conduzione degli stimoli [1] sia interni che esterni; in particolare, il sistema nervoso svolge la funzione trasmettere i segnali nervosi tra le diverse zone dell'organismo e di coordinare sia le funzioni volontarie ed involontarie, sia le funzioni fisiche e psicologiche [2][3].

Tutti gli esseri viventi hanno un sistema nervoso più o meno complesso: nel caso degli organismi unicellulari, come i protozoi, le funzioni di interazione con l'ambiente circostante, elaborazione dei segnali ricevuti e di risposta, sono concentrate a livello della singola cellula; aumentando la complessità degli organismi, queste vengono svolte da cellule altamente specializzate chiamate neuroni, caratterizzate dalla capacità di eccitarsi in seguito ad un impulso elettrico.

In generale, il sistema nervoso è costituito dall'insieme dei neuroni e dalle loro cellule di sostegno [4].

Nei vertebrati il sistema nervoso si distingue in sistema nervoso centrale (definito anche "nevrasse"), collocato all'interno di involucri ossei, e sistema nervoso periferico che ne permette il collegamento con la periferia, ovvero tutti gli organi non nervosi del corpo. A loro volta, sistema nervoso centrale e periferico sono ripartibili in diverse componenti caratterizzate da specifiche funzioni [2][4][5].

### 1.1.1 Sistema nervoso centrale

Il sistema nervoso centrale o nevrasse svolge il ruolo di elaborazione ed integrazione delle informazioni provenienti dagli altri organi e dall'ambiente esterno e di pianificazione di risposte adeguate a questi stimoli.

È costituito dall'encefalo, posto all'interno della scatola cranica, e dal midollo spinale, posto entro il canale vertebrale. In particolare, il sistema nervoso centrale è composto da midollo spinale, tronco encefalico, cervelletto, diencefalo e telencefalo. [4]

### 1.1.2 Sistema nervoso periferico

Il tessuto nervoso che non fa parte del sistema nervoso centrale, ovvero i nervi con annessi i relativi gangli, forma il sistema nervoso periferico. In questo caso è possibile distinguere una parte somatica deputata al movimento e all'espressione dei sensi (costituita dalle fibre nervose che collegano sistema nervoso centrale ai muscoli volontari e ai recettori sensoriali della pelle),

e una autonoma che controlla le funzioni vegetative, ovvero quelle al di fuori del controllo volontario. [4][5][6][7][8]

## 1.2 Cellule del sistema nervoso

Il sistema nervoso è composto da due tipi di cellule: i neuroni e le cellule gliali.

### 1.2.1 Neuroni

I primi, l'unità funzionale del sistema, sono cellule altamente specializzate nella comunicazione veloce e sono i responsabili della generazione e conduzione di impulsi nervosi. Questi, dunque, permettono al sistema nervoso di ricevere, elaborare e trasmettere i segnali anche a lunghe distanze.

Un neurone è composto da diverse parti fondamentali (figura 1.1) che svolgono funzioni specifiche.

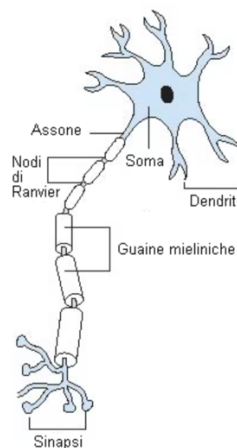


Figura 1.1: struttura schematizzata di un neurone. [12]

Il corpo cellulare, detto anche “soma”, è la parte centrale della cellula e può assumere diverse forme e dimensioni. È luogo del nucleo cellulare e, quindi, del materiale genetico della cellula, ma anche di diversi organuli cellulari come i mitocondri, i ribosomi, i lisosomi e il reticolo endoplasmatico rugoso e apparato di Golgi. Dal soma originano dei prolungamenti citoplasmatici noti come dendriti o assone. I primi svolgono il ruolo cruciale di ricevere e trasmettere al corpo cellulare il segnale proveniente da altri neuroni o da cellule sensoriali e hanno struttura ramificata in modo da aumentare l'area disponibile per ricevere i segnali. A partire dal monticolo assonico origina l'assone, detto anche “neurite” o “cilindrassa”: è il prolungamento principale della cellula e svolge un ruolo fondamentale nella conduzione degli impulsi elettrici lungo la sua intera lunghezza direzionandoli in uscita verso cellule bersaglio [9], come altre cellule nervose, muscoli o ghiandole. Il citoplasma di questa estensione è ricco di microtubuli, neurofilamenti e di mitocondri.

Nei vertebrati le fibre nervose, ovvero l'insieme dell'assone e delle guaine di rivestimento [10], possono essere divise in mieliniche o amieliniche, a seconda della presenza o assenza di una guaina di mielina. Questa è formata da avvolgimenti concentrici di cellule della neuroglia: nel sistema nervoso centrale i responsabili sono gli oligodendrociti, nel sistema nervoso periferico, invece, sono le cellule di Schwann. Gli oligodendrociti mielinizzano più assoni adiacenti, mentre le cellule di Schwann mielinizzano un solo assone. [4][11]

Lungo l'assone mielinizzato sono presenti degli spazi regolari in cui la guaina mielinica è assente, detti "nodi di Ranvier", ovvero zone ad alta permeabilità [11] che corrispondono alla zona in cui una cellula di Schwann o oligodendrocito subentra al precedente [4]. Questa configurazione permette agli impulsi nervosi di saltare da un nodo ad un altro attraverso un processo chiamato "conduzione saltatoria" che permette una trasmissione più veloce del segnale elettrico (10-120 ms) rispetto alle fibre amieliniche (0.5-1.6 ms) [4]. La mielina, inoltre, svolge un ruolo fondamentale per quanto riguarda la protezione meccanica e di nutrimento dell'assone della cellula, ma funge anche da isolante evitando che il neurone possa diffondere l'impulso nervoso alle cellule circostanti [12].

Dal punto di vista morfologico, i neuroni si possono distinguere in [13] (figura 1.2):

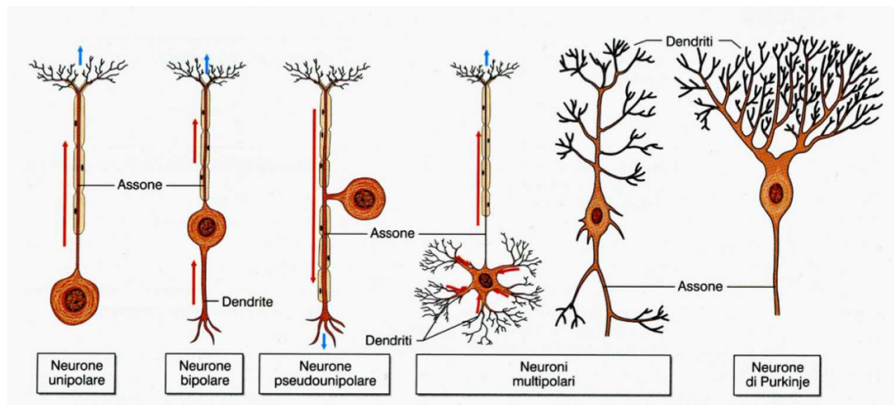


Figura 1.2: classificazione morfologica dei neuroni. [117]

- unipolare: dal soma emerge un unico assone e sono privi dei dendriti. Questa tipologia è rara nei soggetti adulti e si trovano principalmente nell'embrione;
- bipolare: sono presenti due processi che dipartono dal corpo cellulare da poli opposti, ovvero dendrite e assone. Si trovano nella retina, nell'epitelio della mucosa olfattiva, nei gangli vestibolare e cocleare;
- pseudounipolare: è costituito da un unico corpo cellulare e da un unico assone che si divide a "T" dando origine ad un prolungamento centrale, diretto al sistema nervoso centrale, e uno periferico, diretto alla periferia;
- multipolari: costituiti da un unico assone e da molti dendriti. Possono essere ad assone lungo (I tipo di Golgi) o ad assone breve (II tipo di Golgi) [4].

In base alla funzione, i neuroni possono essere classificati in sensitivi, noti anche come neuroni afferenti, deputati alla ricezione di stimoli e al trasporto dell'informazione dagli organi sensoriali al sistema nervoso centrale, e neuroni efferenti, che sono deputati alla trasmissione del segnale dal sistema nervoso centrale alle varie parti dell'organismo. I neuroni efferenti comprendono i motoneuroni somatici (controllo dei muscoli scheletrici) e neuroni autonomici (controllo della muscolatura liscia e cardiaca, ghiandole e alcuni tessuti adiposi). [14][15]

L'assone termina con le giunzioni sinaptiche, ovvero delle strutture altamente specializzate che consentono all'impulso nervoso di viaggiare da un neurone all'altro o ad altre cellule di altri tessuti. In particolare, il segnale elettrico provoca il rilascio di una sostanza chimica noto come neurotrasmettitore che, legandosi ai recettori presenti sui dendriti del neurone con cui fa collegamento, determina un effetto eccitatorio o inibitorio. [4]

I neuroni godono di due principali proprietà: l'eccitabilità e la conducibilità. La prima è la capacità di trasformare gli stimoli interni o esterni convertendoli in impulsi nervosi; la seconda è la capacità di trasmettere l'impulso neuronale, sotto forma di segnale elettrico, lungo la loro intera lunghezza verso altri neuroni o altre cellule. [16]

### *1.2.2 Cellule gliali*

Il sistema nervoso, oltre ai neuroni e dai vasi sanguigni, è composto anche da altri tipi di cellule: le cellule gliali. Svolgono una funzione di protezione, sostegno, nutrizione e comunicazione dei e con i neuroni ed assumono un ruolo di fondamentale importanza nei processi di riparazione dei nervi, ma non partecipano direttamente alla generazione e alla propagazione dello stimolo elettrico.

Si distinguono cellule ependimali, astrociti, cellule della microglia, oligodendrociti, cellule di Schwann e cellule satellite. Le prime quattro tipologie di cellule fanno parte del sistema nervoso centrale, le restanti due, invece, fanno parte del sistema nervoso periferico [9].

Gli astrociti hanno un ruolo di supporto strutturale per i neuroni, contribuiscono alla comunicazione cellulare e sono coinvolti nei processi riparativi. Svolgono anche una funzione di protezione neuronale sia producendo fattori di crescita, sia producendo proteasi capaci di distruggere i residui cellulari originati in seguito ad una lesione e modellizzando la formazione di tessuto cicatriziale.

Gli oligodendrociti sono cellule responsabili di fornire supporto e isolamento ai neuroni nel sistema nervoso centrale attraverso la produzione di una sostanza chiamata mielina.

Nel sistema nervoso periferico, le cellule di Schwann svolgono un ruolo analogo. La differenza sostanziale tra questi due tipi di cellule sta nel fatto che i primi avvolgono più assoni creando

così un'unità oligodendrocitica, costituita da assoni e l'oligodendrocito che li avvolge, le seconde, invece, avvolgono un solo assone. Un'ulteriore differenza fra queste due cellule sta nel fatto che le cellule di Schwann sono in grado di stimolare la rigenerazione di un assone in seguito ad una lesione; gli oligodendrociti, invece, inibiscono la ricrescita assonale.[4]

### 1.3 Struttura dei nervi:

I fasci di assoni prendono nomi differenti a seconda della loro collocazione: nel sistema nervoso centrale sono detti "tratti" o "fasci," nel sistema nervoso periferico, invece, prendono il nome di "nervi". Il compito dei nervi è quello di trasportare le informazioni dalla periferia al sistema nervoso centrale e viceversa [17][18]. All'interno dei nervi gli assoni sono organizzati in complessi che includono [18]:

- Funicoli: sono i raggruppamenti di assoni;
- Fascicoli: sono raggruppamenti di funicoli.

Gli assoni sono compresi entro guaine di tessuto connettivo con funzione di protezione e trofica, distinto, dallo strato più esterno a quello più interno, in epinervio, perinervio ed endonervio (figura 1.3). Il primo, costituito da tessuto fibrocollagenoso lasso particolarmente resistente, ha il compito di proteggere meccanicamente il nervo da eventuali sollecitazioni esterne e di fornire sostegno strutturale mantenendo l'organizzazione e la struttura dei fasci. Il perinervio è lo strato di rivestimento dei fascicoli che, oltre a svolgere una funzione di protezione e sostegno meccanico, svolge anche il compito di favorire gli scambi tra fascicoli.

L'endonervio, infine, è lo strato di rivestimento dei funicoli ed assume un ruolo rilevante nel processo di rigenerazione delle componenti danneggiate.

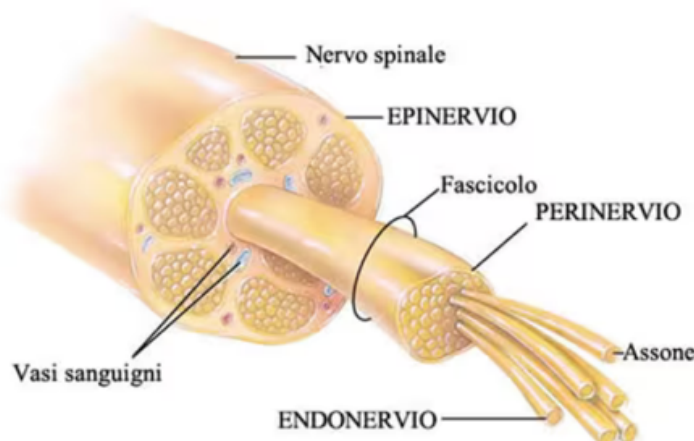


Figura 1.3: struttura schematizzata di un nervo. [19]

All'interno dei nervi si possono trovare sia arterie che vene, fondamentali per garantire nutrizione alle cellule che li compongono [4][19].

I nervi possono variare forma e dimensione a seconda del loro ruolo e della zona che innervano [4].

#### **1.4 Potenziale di membrana e potenziale d'azione**

La membrana cellulare è costituita da un doppio strato lipidico [20] che regola il passaggio dell'acqua e dei soluti tra l'ambiente extracellulare (esterno alla cellula) e quello intracellulare (interno alla cellula). Per sopravvivere, la cellula necessita di scambiare sostanze tra questi due ambienti e ciò è possibile grazie alla presenza di proteine di membrana.

##### *1.4.1 Potenziale di membrana*

Tutte le cellule del nostro organismo hanno una differenza di potenziale di membrana ( $V_m$ ) che nel caso di una cellula neuronale è di  $-70\text{mV}$  (differenza di potenziale tra interno ed esterno). Questo fenomeno si deve alla separazione di carica elettrica tra l'interno e l'esterno della cellula ed è influenzato dai gradienti di concentrazione degli ioni e dalla permeabilità della membrana a questi. Durante l'attivazione cellulare si assiste all'apertura e alla chiusura dei canali ionici permettendo il flusso di ioni attraverso la membrana; questo può variare il potenziale di membrana. Nello specifico, si osserva un leggero accumulo di cariche negative all'interno della cellula, e un parziale accumulo di cariche positive al suo esterno. Questo, però, non vale a dire che nell'ambiente intracellulare si ha solo la presenza di sole cariche negative, e nell'ambiente extracellulare si hanno solo cariche positive [21].

La concentrazione di ioni  $\text{K}^+$  è maggiore all'interno della cellula rispetto all'esterno; al contrario, la concentrazione di ioni  $\text{Na}^+$  è maggiore all'esterno. Inoltre, la membrana del neurone è permeabile al potassio ma relativamente impermeabile al sodio.

Nel caso di una membrana permeabile ad un singolo ione, il suo potenziale è descritto dall'equazione di Nerst:

$$E(mV) = \frac{RT}{zF} \log \left( \frac{[ione]_{est}}{[ione]_{int}} \right)$$

- $R$  costante universale dei gas;
- $T$  temperatura assoluta;
- $F$  costante di Faraday;
- $z$  carica elettrica dello ione;
- $[ione]_{est}$  e  $[ione]_{int}$  sono le concentrazioni rispettivamente dello ione all'esterno e all'interno della cellula.

Il potenziale di equilibrio di uno ione è il potenziale di membrana per cui il gradiente di concentrazione ed elettrico sono uguali ed opposti.

Considerando lo ione  $K^+$ , l'equazione sopra riportata restituisce un valore di  $-90mV$ , ovvero un valore inferiore rispetto ai  $-70mV$  osservati sperimentalmente per un neurone. Infatti, nella generazione del potenziale di membrana non partecipa solo lo ione  $K^+$ , ma anche altri ioni come lo ione  $Na^+$  che, entrando nella cellula, rende il potenziale di membrana a riposo più positivo, e  $Cl^-$ . Per questo motivo, per calcolare il potenziale di membrana a riposo considerando il contributo di tutti gli ioni a cui è permeabile la membrana, si utilizza una formula che generalizza la precedente: l'equazione di Goldman-Hodgkin-Katz. Il potenziale di membrana a riposo, infatti, è determinato dai contributi combinati dei gradienti di concentrazione dei singoli ioni moltiplicato per la loro capacità di attraversare la membrana (permeabilità).

La variazione del potenziale di membrana può essere identificata in tre modi distinti [21]:

- depolarizzazione: la separazione di cariche diminuisce, il potenziale di membrana aumenta, quindi, diventa meno negativo. Gli stimoli depolarizzanti sono stimoli di eccitazione poiché stimolano l'attività cellulare;
- ripolarizzazione: fase che segue alla depolarizzazione e rappresenta il ritorno del potenziale di membrana al suo valore di equilibrio;
- iperpolarizzazione: la separazione di cariche aumenta, il potenziale di membrana diminuisce, quindi, diventa più negativo. Corrisponde ad un'inattivazione della cellula.

Per esempio, si crea depolarizzazione quando si aprono i canali che mediano un flusso di ioni positivi entranti (canali  $Na^+$ ) o un flusso di ioni negativi uscenti (canali  $Cl^-$ ). Si crea iperpolarizzazione quando si aprono i canali che mediano un flusso di ioni positivi uscenti (canali  $K^+$ ) o flusso di ioni negativi entranti (canali  $Cl^-$ ).

[15]

#### *1.4.2 Potenziale d'azione*

Depolarizzando la membrana oltre un certo valore soglia, si ha la generazione del potenziale d'azione, ovvero un rapidissimo cambiamento del potenziale di riposo. Superato questo valore soglia si assiste prima ad una depolarizzazione rapida della membrana e, successivamente, raggiunto il picco di depolarizzazione si assiste ad una ripolarizzazione. Questo comportamento si deve, una volta raggiunta questa soglia, ad un aumento della permeabilità dei canali  $Na^+$  voltaggio dipendenti, che consente l'ingresso nell'ambiente intracellulare di ioni sodio creando un ambiente localmente positivo (fase di depolarizzazione rapida). Questo evento dura per un periodo di tempo molto breve: successivamente all'apertura dei canali  $Na^+$ , infatti, si assiste

alla loro inattivazione e all'apertura dei canali  $K^+$  voltaggio dipendenti, con il conseguente aumento della permeabilità al potassio della membrana; ciò determina la fuoriuscita di ioni  $K^+$ , ovvero di cariche positive, e quindi una ripolarizzazione della membrana (fase di ripolarizzazione). Dopo la ripolarizzazione si assiste ad una fase di iperpolarizzazione postuma. I canali voltaggio dipendenti del sodio rimangono allo stato inattivo (e per potersi riaprire devono prima passare necessariamente dallo stato chiuso) durante il periodo detto "refrattario assoluto", ovvero il periodo in cui non è possibile generare un ulteriore potenziale d'azione, indipendentemente dall'intensità dello stimolo depolarizzante. Nei primi istanti dopo la depolarizzazione, i canali del sodio saranno tutti allo stato inattivo, ma successivamente alcuni torneranno ad avere la capacità di attivarsi e i canali del potassio si stanno lentamente chiudendo riducendo, dunque, la depolarizzazione della membrana. In questa fase, chiamata periodo "refrattario relativo", è possibile generare un nuovo potenziale d'azione, ma solo se lo stimolo supera una soglia di attivazione maggiore.

Nel neurone il potenziale d'azione si genera a livello del monticolo assonico e procede unidirezionalmente verso le terminazioni sinaptiche allontanandosi sempre di più dal punto di insorgenza.

[15][23][24]



## **2. LESIONI DEI NERVI**

### **2.1 Classificazione delle lesioni nervose periferiche**

Le lesioni nervose periferiche (*Peripheral Nerve Injury*, PNI) sono tutte lesioni traumatiche che interessano i nervi [25] e tutte le loro componenti, tra cui le cellule di Schwann, il tessuto connettivo e i vasi sanguigni. La condizione patologica conseguente alle PNI è detta “neuropatia periferica” che consiste in un cattivo funzionamento dei nervi [26] portando, inevitabilmente, ad un peggioramento della qualità della vita dell’individuo [18].

Le PNI sono un problema clinico con un’incidenza di 300.000 casi l’anno in Europa [27]. Tra le cause si riconoscono principalmente ferite da taglio, traumi con meccanismi di stiramento o trazione, compressione o folgorazione, vibrazioni, e malattie come tumori, HIV, diabete o malattie genetiche ereditarie [28].

A differenza dei neuroni del sistema nervoso centrale, quelli del sistema nervoso periferico possono rigenerarsi spontaneamente. Tuttavia, questa capacità dipende da molti fattori come l’età del paziente, il nervo coinvolto, la presenza di ulteriori patologie di tipo medico e la gravità del danno. Ovviamente, più il nervo è lesionato, più sarà difficile il recupero del paziente.

Una buona classificazione delle lesioni nervose è fondamentale per aiutare i professionisti a comprendere la gravità del danno e per rispondere adeguatamente con i giusti trattamenti e predire la prognosi del soggetto affetto. Esistono due classificazioni delle PNI: quella di Seddon e quella di Sunderland [29] (tabella 1) (figura 2.1).

La classificazione di Seddon è basata sull’estensione della lesione al rivestimento mielinico, agli assoni e al tessuto connettivo di rivestimento che funge da guida nella rigenerazione del nervo danneggiato. Si distinguono:

- neuroaprassia: è una compromissione temporanea delle funzioni del nervo, ma senza la perdita della continuità atomica e compromissione del tessuto connettivo. In particolare, è un danno segmentale a carico della mielina. Può verificarsi quando una parte del corpo è sottoposta ad una pressione prolungata nel tempo. La conduzione nervosa è rallentata o assente a livello della lesione, ma preservata distalmente e prossimamente alla lesione. L’assone non è separato dal corpo cellulare e, dunque, non si attiva il processo di degenerazione Walleriana, ovvero la degenerazione e il riassorbimento del segmento distale alla lesione di un nervo nel caso in cui sia stato danneggiato in tutto il suo spessore [45]. Questo tipo di danno ha una prognosi favorevole e la ripresa completa avviene entro 12 settimane. Non necessita di terapia chirurgica, ma solo di gestione medica.

- assonotmesi: è una lesione del nervo più grave rispetto a quella descritta precedentemente ed è data da un danneggiamento dell'assone, ma non delle guaine connettive più esterne (endonervio, perinervio, epinervio). In questo caso si attiva un processo di degradazione, detta degenerazione Walleriana, della parte assonale lesa. Nella maggior parte dei casi il recupero è completo in quanto non è lesa l'endonervio che funge da guida per la rigenerazione, ma è particolarmente lento. L'assonotmesi viene riparata solo quando non si nota recupero entro 3-6 mesi dai test elettrodiagnostici.
- neurotmesi: identifica la lesione più grave di un nervo periferico e consta di una recisione fisiologica e anatomica sia dell'assone, della guaina mielinica e che del tessuto connettivo. Generalmente questo tipo di lesioni richiede interventi chirurgici con trapianti di tessuto nervoso per ripristinare la continuità nel nervo.

Nel 1951 la classificazione di Seddon è stata ampliata da quella di Sunderland che suddivide le lesioni nervose in cinque gradi. Il I, II e V grado di Sunderland equivalgono rispettivamente alla neuroaprassia, assonotmesi e neurotmesi. Il III grado corrisponde ad una lesione dell'assone e dell'endonervio, mentre il IV grado identifica un danneggiamento a livello dell'assone, dell'endonervio e del perinervio. In quest'ultimo caso la continuità del nervo è garantita solo dall'epinervio.

[30][31][32][53]

Seddon	Sunderland	caratteristiche
Neuroaprassia	I	danni solo alla mielina
Assonotmesi	II	divisione solo degli assoni intraneurali
	III	Divisione assoni ed endonervio
	IV	divisione assoni, endonervio e perinervio
Neurotmesi	V	divisione completa di tutte le componenti

Tabella 1: classificazione delle lesioni nervose periferiche secondo Seddon e Sunderland

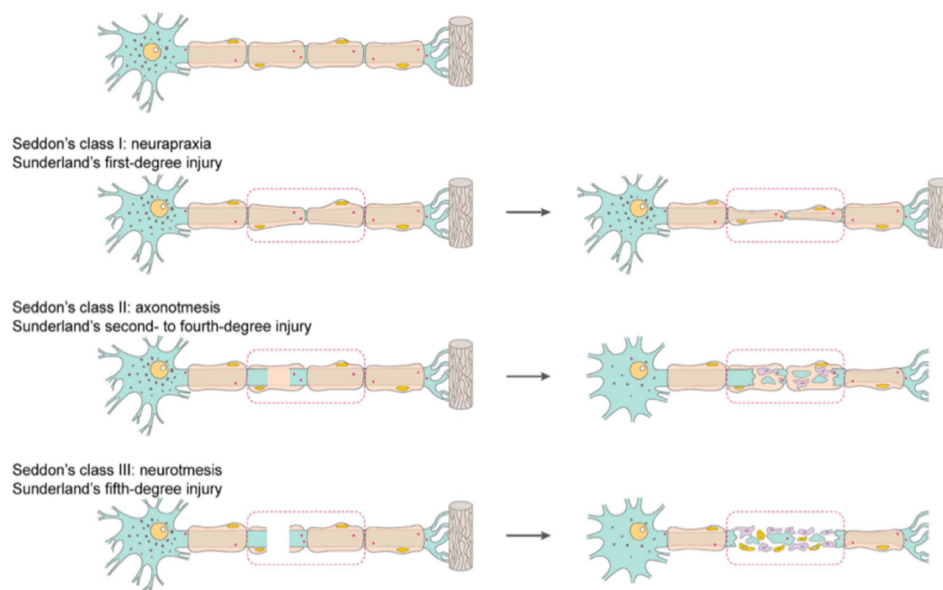


Figura 2.1: rappresentazione schematica delle lesioni nervose periferiche secondo Seddon e Sunderland.

## 2.2 Fisiopatologia della lesione e della rigenerazione nervosa

La lesione nervosa attiva un meccanismo di ricostruzione del citoscheletro dell'assone che può essere distinto in due fasi consecutive: la fase di degenerazione, nota anche come degenerazione Walleriana, e la fase di rigenerazione nervosa (figura 2.2).

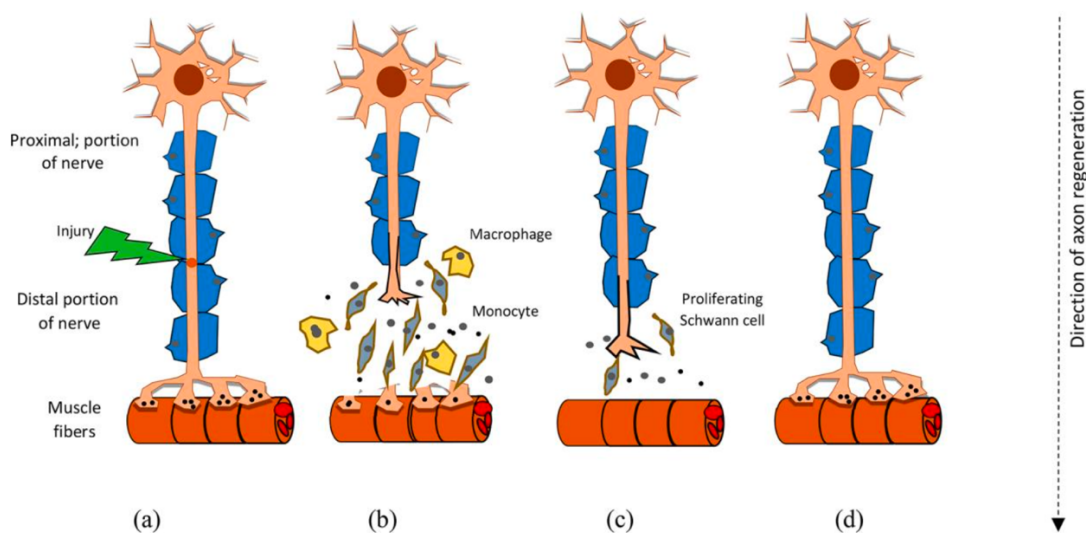


Figura 2.2: processo di degenerazione e rigenerazione del nervo periferico: (a) recisione nervo; (b) le proteine citoscheletriche locali prodotte dal soma supportano la rigenerazione assonale; (c) allineamento delle cellule di Schwann a formare le bande di Bugner; (d) nervo rigenerato. [33]

A livello del corpo cellulare avvengono una serie di modificazioni conformazionali e cambiamenti metabolici: non vengono più prodotti i neurotrasmettitori, fondamentali per la comunicazione neuronale, ma aumenta la produzione di proteine in modo da promuovere la

ricrescita dell'assone lesionato. A livello del soma, inoltre, si assiste ad una serie di cambiamenti morfologici come lo spostamento del nucleo in periferia e l'allargamento dei suoi porti per il passaggio dell'mRNA; i tratti intradendritici diventano convessi e le cisterne del reticolo endoplasmatico si dilatano [34] (figura 2.3). Il neurone, dunque, da cellula specializzata nella conduzione di impulsi nervosi, si converte in cellula deputata alla produzione di sostanze necessarie alla riparazione della lesione.

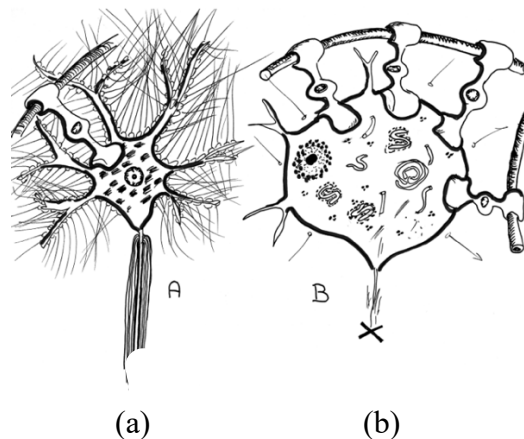


Figura 2.3: (a) corpo cellulare del neurone in condizioni basali, (b) corpo cellulare del neurone attivato per la generazione in seguito all'interruzione dell'assone. [34]

Il moncone distale alla lesione, invece, va incontro a degenerazione Walleriana: l'assone si frammenta e i suoi residui vengono eliminati attraverso un processo di fagocitosi dai globuli bianchi [35].

Nel processo di riparazione dei nervi, la glia nel sistema nervoso periferico si converte in un fenotipo rigenerativo e non provvedono più alla produzione di mielina: a questo livello, infatti, le cellule di Schwann formano dei tubi endoneurali orientati longitudinalmente di lamina basale detti "bande di Bugner" (colonne allineate di cellule di Schwann e laminina) che fungono da guide per incanalare la ricrescita e la rigenerazione del nervo permettendogli possa riconnettersi con la parte a monte della lesione [36] e ricontattare gli organi bersaglio (fibre muscolari e gli organi sensitivi). Nel processo di rigenerazione, dunque, le cellule di Schwann svolgono un ruolo particolarmente importante: sostengono la crescita degli assoni e la loro successiva mielinizzazione.

Tuttavia, dopo la rigenerazione, l'assone potrebbe connettersi con le stesse fibre muscolari con cui faceva connessione precedentemente alla lesione, ma potrebbe innervare più fibre muscolari formando unità motorie (motoneurone e fibre muscolari che innerva [37]) giganti. Questo fenomeno, chiamato "dell'adozione", è la principale causa per solitamente non si ha un recupero completo delle funzionalità del nervo.

Inoltre, se la rigenerazione dell'assone è tardiva, le cellule di Schwann che lo avvolgono degenerano impedendo la crescita prossimale dell'assone.

Nel progredire verso valle gli assoni in via di rigenerazione emanano pseudopodi che si connettono con i siti sinaptici vacanti in seguito alla lesione: questo fenomeno prende il nome di “*collateral sprouting*”.

L'entità del recupero può essere influenzata da diversi fattori come l'estensione e/o diffusione della lesione, la natura della lesione, la zona lesa, l'età del soggetto, il tempo in cui la lesione si è instaurata. [39][4][38]

### **2.3 Trattamenti clinici**

Come già detto, i neuroni del sistema nervoso centrale hanno una capacità intrinseca di rigenerare, ma questo processo spontaneo potrebbe non essere sufficiente per ottenere un completo recupero delle funzioni del nervo danneggiato. A differenza dei modelli animali comunemente utilizzati nella sperimentazione scientifica, come topi e conigli, nell'essere umano gli assoni devono attraversare distanze notevolmente maggiori; a questo, inoltre, si aggiunge il lento tasso di rigenerazione nervosa, di circa 1–3mm al giorno ed una progressiva diminuzione della capacità rigenerativa dei nervi nel tempo e nella distanza.

Solitamente è consigliato riparare il nervo danneggiato subito dopo la lesione, ma ciò non è sempre possibile. Per esempio, se sia ha che fare con una lesione senza discontinuità, si cerca di fare rigenerare il nervo spontaneamente prima di considerare un intervento chirurgico [53].

Tuttavia, anche dopo una riparazione immediata, il recupero del soggetto può essere complicato, per esempio, dall'errata direzione degli assoni rigeneranti che può portare ad innervazione inappropriata, e quindi, perdita di sensibilità. [50]

Sperimentalmente è stato osservato che le lesioni nervose periferiche possono essere recuperate se riparate entro tre mesi; ritardare la riparazione riduce notevolmente la possibilità di recupero. [53]

Come visto precedentemente, esistono diversi tipi di lesioni ai nervi a seconda della loro gravità; dunque, anche i metodi di trattamento differiscono notevolmente tra di loro.

I trattamenti alle lesioni nervose consistono in una serie di approcci non chirurgici e chirurgici volti a ripristinare la continuità e le funzionalità del nervo danneggiato. Come è logico pensare, i trattamenti non chirurgici sono preferiti rispetto a quelli chirurgici, ma non sempre sono di eguale efficacia [40]. Tra i trattamenti non chirurgici si possono individuare, per esempio, i trattamenti farmacologici, la stimolazione elettrica o magnetica, e l'introduzione di fattori di

crescita dei nervi e la fototerapia laser. È possibile combinare questi metodi per ottenere risultati migliori nella rigenerazione del tessuto nervoso.

### 2.3.1 Trattamenti non chirurgici

#### 2.3.1.1 Trattamenti farmacologici

In commercio non esistono farmaci specifici per il trattamento delle PNI e, dunque, si fa ricorso a cure tipiche di altre branche della medicina come la neurologia e psichiatria. Infatti, possono essere utilizzati antidepressivi triciclici e antiepilettici.

I farmaci maggiormente utilizzati fanno parte della famiglia degli analgesici (acetaminofene, aspirina, ibuprofene), corticosteroidi (betametassone, prednisone, prednisolone) e oppioidi (metadone). È da specificare il fatto che questo tipo di trattamenti sono utili solo ad alleviare il dolore, ma non possono in alcun modo favorire la rigenerazione nervosa in maniera diretta, soprattutto nei casi più gravi [41][42].

#### 2.3.1.2 Stimolazione elettrica

Tra gli approcci terapeutici non chirurgici per eccellenza vi è la stimolazione elettrica (*electrical stimulation*, ES) [40] che consiste nell'applicazione di corrente elettrica direttamente al nervo o indirettamente tramite elettrodi collocati sulla superficie cutanea. Questo metodo ha riscosso successo in seguito alla scoperta che la corrente elettrica influenza l'attività di alcune cellule, tra cui i neuroni.

Esistono, molti tipi e metodi di stimolazione elettrica come la stimolazione nervosa elettrica percutanea (*percutaneous electrical nerve stimulation*, PENS) e stimolazione nervosa elettrica transcutanea (*transcutaneous electrical nerve stimulation*, TENS) [42]. Un approccio promettente nel favorire la rigenerazione del nervo periferico è anche quello di applicare la stimolazione elettrica direttamente sul nervo lesionato [53]: ciò può avvenire durante il periodo intraoperatorio, con il sito di operazione aperto e tramite elettrodi inseriti asepticamente per evitare infezioni, ma anche successivamente. Infatti, nel caso di lesioni nervose gravi è possibile applicare ES anche in seguito all'intervento chirurgico tramite dispositivi elettrici impiantabili (biodegradabili e non) che sono stati in grado di generare un campo elettrico e fornire correnti attraverso i ceppi nervosi senza la necessità di una fonte di stimolazione esterna [96] (figura 2.4). Nell'immagine seguente vi è un'illustrazione comparativa tra i due metodi per fornire la stimolazione elettrica terapeutica descritti precedentemente: l'utilizzo di stimolatori elettrici portatili durante il periodo intraoperatorio (figura 2.4 a) e stimolatori elettrici wireless

bioriassorbibili (figura 2.4 b) per una stimolazione sia intraoperatoria che post-operatoria per un periodo di tempo prolungato.

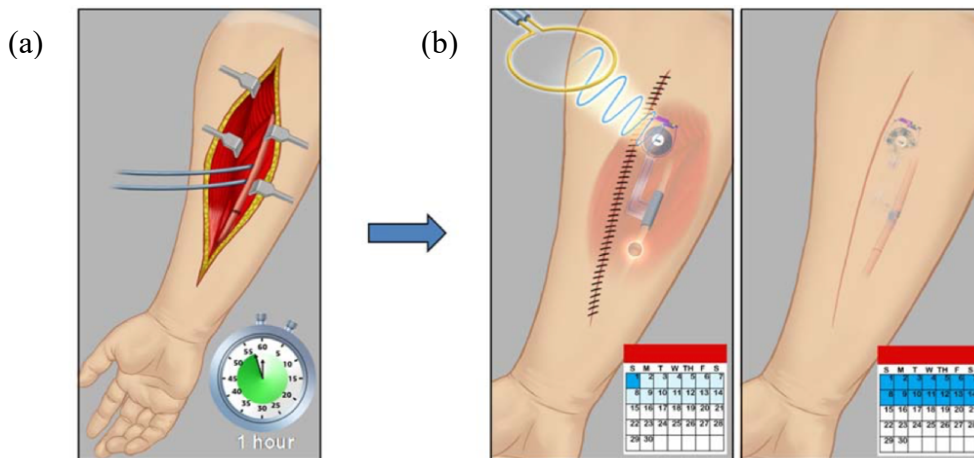


Figura 2.4: protocolli clinici per la stimolazione del nervo periferico. (a) protocollo clinico per la stimolazione elettrica terapeutica intraoperatoria per la riparazione del nervo utilizzando uno stimolatore nervoso commerciale portatile (b) protocollo clinico che sfrutta la nuova proposta di stimolatore elettrico wireless bioriassorbibile. [57]

Quest'ultimo approccio, affiancato dall'utilizzo di condotti nervosi realizzati con polimeri conduttori, verrà ulteriormente approfondito successivamente.

Studi condotti riguardo a questo tipo di trattamento suggeriscono l'utilizzo di un protocollo a basse frequenze rispetto ad uno con frequenze più elevate che, oltre ad essere meno efficienti nel favorire il recupero del nervo, potrebbero anche peggiorare la lesione nervosa [40][45][50]. Infatti, gli studi condotti da Lu et al. [47] e Liao et al. [48] hanno mostrato come una stimolazione di 1 mA a 200 Hz porti ad una minore rigenerazione nervosa rispetto ad una stimolazione della stessa ampiezza, ma a frequenze minori come 1 Hz o 2 Hz. Dall'analisi istologica è anche emerso che i gruppi sottoposti ad elettrostimolazione a 2 Hz mostravano una struttura maggiormente matura con fibre mielinizzate, maggiore densità assonale e di vasi sanguigni rispetto ai controlli (gruppi non sottoposti ad ES). In generale, dunque, gli studi in letteratura [47][48][49][50][52][57] hanno suggerito che la stimolazione elettrica dei nervi lesionati a bassa (2 Hz) o media frequenza (20 Hz) potrebbero portare ad un migliore recupero della lesione accelerando la loro ricrescita. [48]

Il gruppo di ricerca di Chan et al. [50] (figura 2.5) ha condotto uno studio su un modello di ratto in cui il nervo femorale è stato reciso e successivamente riparato tramite tecniche microchirurgiche. Il nervo è stato sottoposto a stimolazione elettrica a 20 Hz per un'ora.

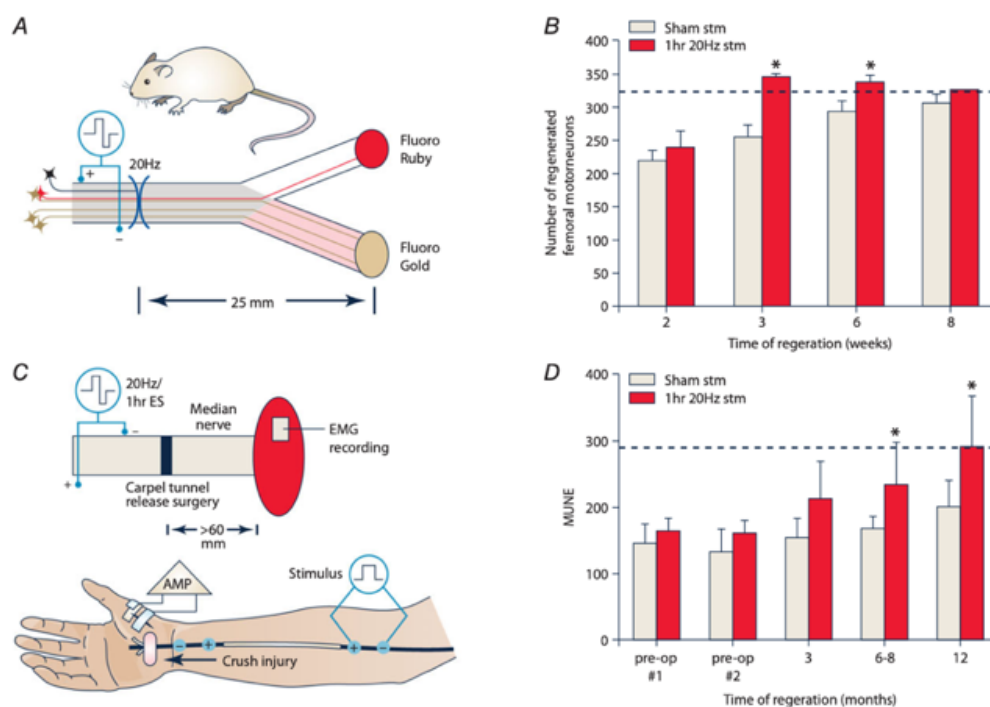


Figura 2.5: effetti della stimolazione elettrica in modelli animali e nell'uomo. [50]

Lo studio ha mostrato come in tutti i motoneuroni vi sia stata rigenerazione assonale entro 3 settimane dalla lesione, rispetto alle 8-10 settimane necessarie nei ratti di controllo. Questo tipo di trattamento è stato anche sperimentato su pazienti umani affetti da sindrome del tunnel carpale: considerando il nervo non stimolato elettricamente in seguito all'intervento chirurgico, non si ha un aumento significativo di unità motorie rispetto al numero preoperatorio. Stimolando elettricamente il nervo (nervo mediano), invece, si assiste alla completa reinnervazione del muscolo [52].

Ovviamente, a causa della differenza nella grandezza delle fibre nervose tra ratti ed essere umano, il tempo necessario per la guarigione del nervo è maggiore negli uomini.

Nello studio [52] è stato scoperto che, in realtà, periodi di stimolazione maggiori ad un ora sono inefficaci per la rigenerazione di neuroni sensoriali.

Il meccanismo della crescita neuronale promossa dall'ES non è stato ancora pienamente compreso, ma sono state sviluppate recentemente diverse teorie. Secondo i recenti studi, la stimolazione elettrica promuove la crescita assonale attraverso la promozione di cAMP (*cyclic adenosine monophosphate*), aumenta l'espressione di fattori neurotrofici, come NGF (*nerve growth factor*), BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*), GDNF (*glial cell derived neurotrophic factor*) [50][51][52], necessari alla crescita nervosa e al differenziamento di neuroni e sinapsi, e i loro recettori, e di proteine citoscheletriche (come l'actina e la tubulina) [52]. Inoltre, l'ES sembrerebbe influire anche sull'espressione genica e influisce sull'orientamento della crescita dei neuriti [43][44][50][52].



È stato provato, inoltre, che l'elettrostimolazione dei nervi alteri il potenziale di membrana consentendo un afflusso di  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulare nel citoplasma [54], e aumenti l'espressione della proteina di base della mielina, favorendo, dunque, la proliferazione delle cellule di Schwann. Tutto questo è accompagnato da una maggiore attività dei macrofagi nell'eliminazione dei detriti di cellule di Schwann.

Queste terapie elettriche sono però limitate alla stimolazione intraoperatoria o alle stimolazioni transcutanee postoperatorie tramite stimolatori elettrici commerciali portatili [43][53]. Dunque, possono essere applicate per periodi di tempo particolarmente brevi e possono essere causa di infezione. Inoltre, in entrambi i casi, vengono utilizzate apparecchiature molto ingombranti e dispositivi di alimentazione per fornire i segnali elettrici desiderati. [43]

Al fine di superare completamente o parzialmente le problematiche legate alla stimolazione elettrica diretta sul nervo, e la necessità di una batteria impiantabile che limita la durata del dispositivo (spesso di grandi dimensioni) [56], sono stati proposti dei raccoglitori di energia impiantabili (*implantable energy harvesters*, IEH), alimentati da energia ricavata direttamente dall'organismo in cui sono impiantati, dai quali è possibile ricavare degli stimolatori elettrici autoalimentati (*self-powered implantable medical electronics*, SIME) [43][55].

Il corpo umano, infatti, è in sé un'abbondante fonte di energia espressa in forma chimica, termica e meccanica [56]; è, dunque, ricavabile non solo dal suo stesso movimento, ma anche dal battito cardiaco, dalla respirazione, dal flusso sanguigno e dalla reazione redox del glucosio [55].

Tra gli IEH tipici si possono riconoscere, per esempio, quelli basati sulle celle a biocarburante (lattato o glucosio) che convertono l'energia chimica in energia elettrica, sull'effetto triboelettrico e piezoelettrico, che convertono l'energia meccanica in energia elettrica, e termoelettrico, che convertono il calore corporeo in energia elettrica [56]. La biocompatibilità di questi dispositivi può essere garantita utilizzando materiali biocompatibili nella costruzione; se ciò non è possibile si può procedere incapsulandoli in strutture biocompatibili. È importante, inoltre, il processo di miniaturizzazione con il quale è possibile ridurre le dimensioni dei dispositivi: grandi dimensioni dei dispositivi spesso comportano interventi chirurgici più rilevanti e difficoltà nell'innesto all'interno del paziente. [55]

Nel 2018 Koo et al. [57] hanno proposto uno stimolatore wireless impiantabile e biorisorbibile per migliorare il recupero funzionale del nervo sciatico reciso di un roditore (figura 2.6 c-d).

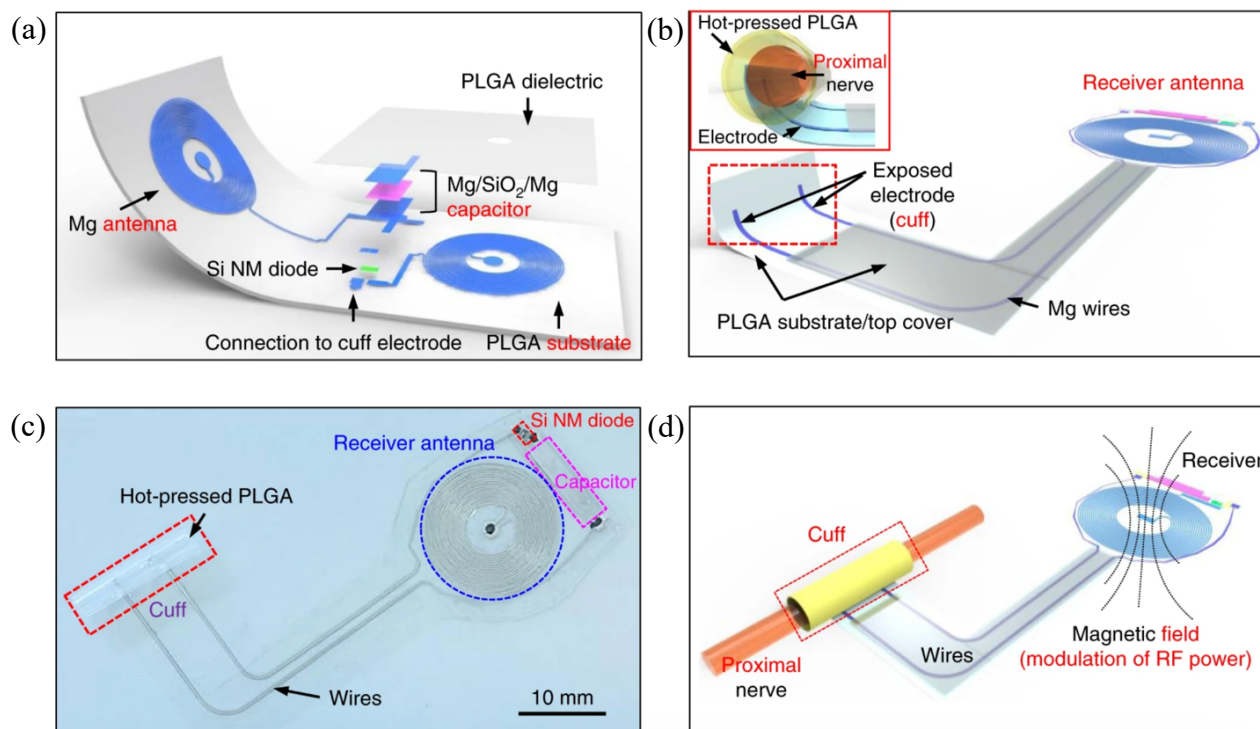


Figura 2.6: illustrazione schematica del design del dispositivo wireless biorisorbibile sviluppato da Koo et al. (a) ricevitore wireless; (b) elettrodo del dispositivo che circonda il nervo periferico; (c) e (d) immagini complete del dispositivo. [57]

Il dispositivo sviluppato si compone di due elementi: un ricevitore wireless che agisce da raccogliatore di potenza a radiofrequenza impiantabile per via sottocutanea (figura 2.6 a) ed una componente elettrica che comprende l'elettrodo con il quale instaurare la connessione al nervo periferico da trattare (figura 2.6 b). Le due parti sono collegate tramite fili di magnesio (Mg). La prima è composta da due bobine di magnesio (Mg) che fungono da antenna, un interstrato dielettrico PLGA, uno strato di nanomembrana di silicio drogato come diodo e un condensatore Mg/diossido di silicio ( $\text{SiO}_2$ )/Mg. Nella seconda l'elettrodo circonda il nervo assieme ad una struttura tubulare di PLGA. La stimolazione viene effettuata tramite un'ulteriore bobina di trasmissione per induzione elettromagnetica.

La degradazione, una volta a contatto con i fluidi biologici, avviene in maniera controllata e in un lasso di tempo ben definito: i materiali costituenti si dissolvono entro tre settimane mentre i residui scompaiono completamente dopo 25 giorni [57] (figura 2.7). Ciò ha permesso di evitare un secondo intervento chirurgico per la rimozione del dispositivo, diminuendo, così, le possibili complicazioni che ne potrebbero seguire.

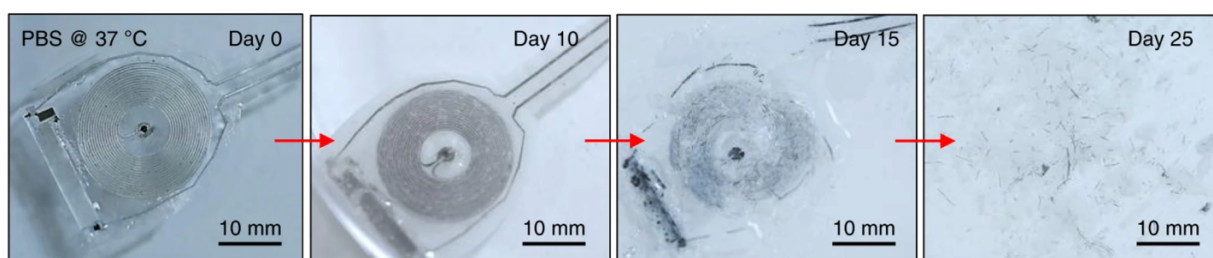


Figura 2.7: fotografie del dispositivo a diversi giorni dall'impianto nel soggetto. Si noti il processo di degradazione totale a 25 giorni. [57]

Se da un lato in letteratura sono state presentate molte prove a favore dell'efficacia della stimolazione nervosa sia nei modelli animali che umani, dall'altro questo metodo può portare anche a una ricrescita assonale mal mirata, ad un'eccessiva ramificazione assonale e innervazioni multiple alle giunzioni neuromuscolari [46].

### 2.3.2 Trattamenti chirurgici

Nonostante gli importanti progressi nella chirurgia del nervo periferico, ad oggi non è ancora stata individuata una strategia ottimale e, spesso, i trattamenti chirurgici danno risultati tutt'altro che soddisfacenti [58]. Sono state sviluppate varie tecniche di riparazione a seconda del tipo di lesione, della lunghezza tra spazio prossimale e distale e dalla collocazione del danno. Nei casi più gravi di lesione, in cui si ha la completa recisione del nervo e di tutte le sue componenti (neurotmesi), lo spazio tra moncone distale e prossimale può essere classificato in base alla sua lunghezza: meno di un centimetro, fino a cinque centimetri e più lungo di cinque centimetri [59]. I protocolli chirurgici sono estremamente diversi a seconda del caso, in modo da garantire il migliore recupero possibile e ridurre la probabilità di tensionamento. È stato dimostrato, infatti, che uno stretching del nervo periferico per oltre il 10 % della lunghezza a riposo diminuisce il flusso sanguigno del 50 % [59]. Nella maggior parte dei casi, infatti, l'eccessivo tensionamento è causa dell'insuccesso dei trattamenti chirurgici ai nervi: una cicatrice gliale localizzata piuttosto che consentire la rigenerazione neurale [111]; le suture, dunque, dovranno essere tali da non portare a questa condizione e dovranno essere effettuate, ovviamente, con materiali perfettamente tollerati per evitare reazioni da corpo estraneo. [34]

Nel caso di lacune nervose inferiori ad un centimetro, la procedura standard consiste nella "neuroraffia" (figura 2.8), ovvero una sutura diretta *end-to-end* dei due monconi del nervo (prossimale e distale) tramite tecniche microchirurgiche [45][59]. Questa tecnica può essere effettuata quando le due estremità possono essere avvicinate in assenza di tensione in un letto ben vascolarizzato [31]. È importante il corretto allineamento dei due monconi per evitare che

gli assoni rigenerino in tubi endoneurali inappropriati portando, di conseguenza, ad uno scarso recupero funzionale; per farlo si individuano dei punti di riferimento superficiali come, per esempio, vasi sanguigni sull'epinervio [59].

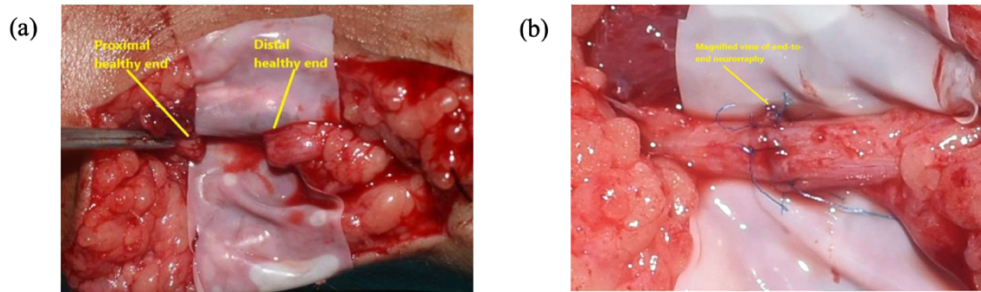


Figura 2.8: fotografie intraoperatorie di un paziente di 18 anni presentante una lesione acuta di tre mesi al polso sinistro con paralisi del nervo ulnare. (a) spazio tra moncone distale e prossimale di circa 1cm derivato dall'asportazione di un neuroma; (b) sutura diretta con neurografia *end-to-end*. [59]

Esistono tre modalità di sutura dei due monconi: epineurale, perineurale e fascicolare di gruppo. La prima è la modalità più semplice, più veloce e quella che comporta la minima manipolazione chirurgica, ma può portare facilmente alla formazione di tessuto cicatriziale e, a causa delle suture solo sulla guaina più esterna del nervo, ad una rigenerazione nervosa in direzioni scorrette [45]. Le suture, inoltre, potrebbero portare a una proliferazione fibroblastica ostacolando, di conseguenza, la rigenerazione e nervosa. [58]

Per superare le potenziali problematiche che potrebbero derivare dalla sutura dei due monconi è possibile utilizzare la colla di fibrina che può essere applicata rapidamente e facilmente in condizioni di emergenza anche in assenza di chirurghi esperti; tuttavia, non è utilizzabile nel caso delle lesioni più gravi. [42]

Nel caso in cui non sia possibile la riparazione *end-to-end* e, quindi, nel caso in cui la riparazione diretta comporti la tensione nel sito [31][60], i protocolli chirurgici prevedono un l'utilizzo di innesti nervosi che consistono in un vero e proprio trapianto di nervo dalla stessa specie [31][34][42]. Un singolo innesto, dunque, unisce i due monconi del nervo reciso con un nervo donatore di diametro simile; il risultato è il ripristino della sua continuità. [31]

La scelta del nervo da trapiantare dipende da alcuni fattori come, per esempio, il diametro dell'ospite e del donatore, la lunghezza degli innesti, il numero di fascicoli, il modello fascicolare, l'area e la forma della sezione trasversale e le preferenze del paziente e chirurgo [42][60].

Si individuano diversi tipi di innesti:

- autologhi (o omoinnesti): sono segmenti di tessuto proveniente dal paziente stesso. Vengono rimossi chirurgicamente da un sito anatomico e successivamente trapiantati

nel sito di interesse per colmare il divario tra i due monconi. Il paziente, dunque, è sia il donatore, che il ricevente. [45]

- omologhi (o alloinnesti) se provenienti da un altro individuo umano (in vita o cadavere);
- eterologhi (o xenoinnesti) se ottenuti da un organismo di una specie diversa da quella umana. Hanno maggiore disponibilità rispetto ai due precedenti, ma attualmente non ci sono tessuti nervosi non umani approvati per l'utilizzo sull'uomo. [61]

Nel caso di *gap* nervosi fino a cinque centimetri si procede con l'utilizzo di innesti [59].

In letteratura [31][33][42][45][58][59][60], l'innesto autologo è universalmente riconosciuto come il trattamento *gold standard* per le lacune nervose. Essendo identici chimicamente, biologicamente e strutturalmente al tessuto nativo, questi tipi di innesto hanno portato a risultati estremamente soddisfacenti. Infatti, la presenza di cellule di Schwann, che ricercano in continuazione l'assone in rigenerazione, fattori neurotrofici, molecole di adesione e una lamina basale che garantisce un ambiente adiuvante per la ricrescita nervosa, ha reso gli innesti autologhi degli scaffold immunologicamente inerti che promuovono il recupero funzionale nel nervo danneggiato. [45]

Sebbene il nervo surale sia l'autoinnesto più comunemente usato (figura 2.9), se ne possono individuare ulteriori come i nervi intercostali, i nervi peroneali superficiali e profondi, i nervi cutanei posteriori e laterali della coscia, i nervi cutanei superficiali, il ramo cutaneo dorsale del nervo ulnare e i nervi cutanei mediali e laterali dell'avambraccio (anterobracchiali) [45][59][65]. I protocolli chirurgici prevedono, inoltre, l'utilizzo di innesti provenienti da siti il più possibile vicini alla lesione in modo da evitare ulteriori incisioni [60] e prevedono l'inversione nel loro orientamento in modo da massimizzare la crescita assonale [31].

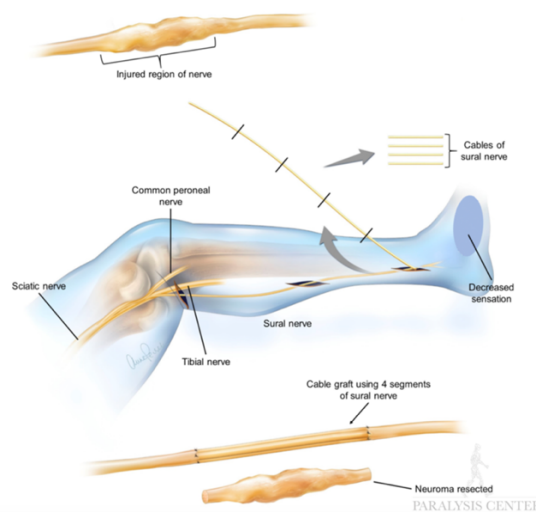


Figura 2.9: rappresentazione schematica di un innesto nervoso autologo dal nervo surale. [62]

Inoltre, la scelta del sito donatore dipende dalla posizione, dalla dimensione e dal diametro del nervo lesionato della lacuna nervosa [45]: nella pratica clinica si cerca sempre di ottenere innesti più lunghi del 10-20 % del *gap*, in modo da ridurre il più possibile la tensione nel sito [60]. In tutte le tecniche di riparazione, infatti, è di fondamentale importanza ridurre al minimo la probabilità di tensionamento del sito di riparazione [65].

Il principale beneficio dell'omoinnesto risiede nella sua totale non immunogenicità fornendo, inoltre, cellule di Schwann e fattori neurotrofici necessari alla rigenerazione assonale [65]. Tuttavia, presenta alcune problematiche come limitata disponibilità del tessuto, la potenziale differenza tra le dimensioni del tessuto, il sacrificio di un nervo sano e, quindi, la perdita di sensibilità nell'area in cui il nervo viene prelevato, una seconda incisione e tutte le problematiche ad essa connessa: formazione del neuroma e cicatrici nel sito donatore, maggiore tempo di recupero, due suture [42][45][59]. Oltre a questo, si deve anche considerare la sfida crescente nell'ottenere il consenso del paziente che, spesso, è influenzato dalle garanzie limitate di successo dell'intervento (la percentuale di successo in seguito all'intervento è del 50%). [45][58]

Un'alternativa agli innesti autologhi sono gli alloinnesti con i quali il nervo donatore viene prelevato da cadaveri umani o da un donatore in vita. La disponibilità degli innesti cadaverici è molto abbondante, e a differenza degli innesti autologhi, il loro utilizzo non comporta morbidità del sito donatore e il nervo danneggiato del ricevente può essere sostituito con lo stesso tipo di nervo del donatore [42].

Questi innesti forniscono cellule di Schwann che da un lato fungono da guida per la rigenerazione assonale e da supporto per la rimielizzazione [65], ma dall'altro incitano una risposta del sistema immunitario del soggetto ospite [31]. Si richiedono, dunque, terapie immunosoppressive per evitare il rigetto dell'innesto. A differenza del trapianto di altri organi solidi, l'allograpianto nervoso richiede solo un'immunosoppressione temporanea [65]: l'immunogenicità, infatti, diminuisce man mano che le cellule ospite vengono incorporate nell'innesto [60].

Nei trapianti di questo genere, il paziente resta comunque suscettibile a potenziali infezioni, al pericolo di trasmissione di malattie e, nei casi più gravi, anche all'insorgere di tumori. L'immunosoppressione può essere evitata nel caso di innesti decellularizzati (la decellularizzazione può essere effettuata tramite tecniche come cicli ripetuti di congelamento-scongelo, iofilizzazione, esposizione alle radiazioni, degradazione enzimatica) ovvero innesti nervosi appositamente trattati per distruggere le cellule donatrici in modo da renderlo non immunogenico [31][59]. Nonostante ciò, la struttura nervosa interna resta integra

facilitando, dunque, la rigenerazione assonale [31][45]. Un esempio di alloinnesto decellularizzato che ha ricevuto l'approvazione per la commercializzazione da parte della Food and Drug Administration (FDA) è Avance<sup>®</sup> sviluppato da AxoGen Inc. (Alachua, FL, USA). Le opzioni per la ricostruzione di lesioni nervose con *gap* di oltre cinque centimetri prevedono l'utilizzo di innesti di nervi vascolarizzati e il trasferimento di nervi [59]. Nel 2009 Avance<sup>®</sup> è stato oggetto di studi clinici su due nervi dorsali e otto sensoriali digitali di cinque uomini e due donne: innesti di 0.5-30mm di lunghezza hanno portato al ripristino delle funzioni nervose entro 9 mesi [74].

Il trasferimento nervoso viene effettuato qualora la lesione non sia riparabile tramite innesto come nel caso di una lacerazione, che interrompe la comunicazione tra nervo e midollo spinale, o un'avulsione radicolare [60][63]. È, infatti, ben consolidato nelle tecniche chirurgiche per la cura delle lesioni del plesso brachiale. [40]

La tecnica consiste nella recisione intenzionale di un nervo sano per poi collegarlo alla parte distale di un nervo danneggiato in una porzione prossimale [63][64] (figura 2.10). L'utilizzo di questa pratica è fortemente limitato dalla limitata disponibilità di nervi donatori e dalla possibile perdita di funzione dal sito donatore [65].

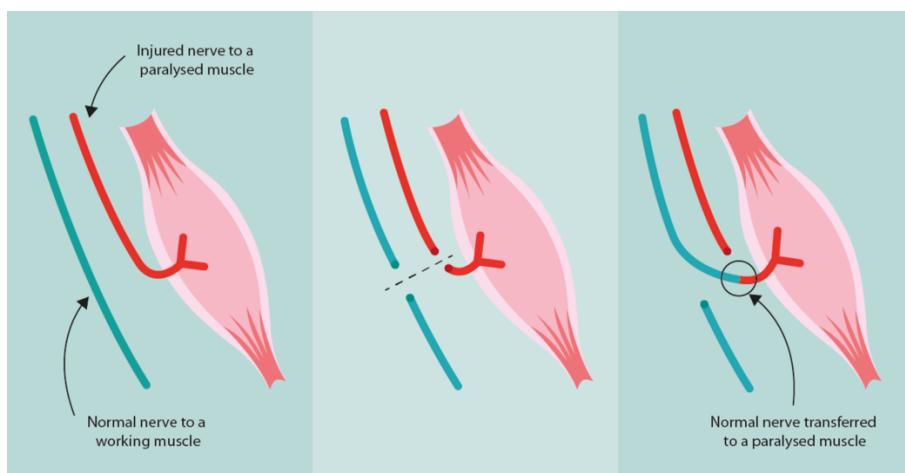


Figura 2.10: rappresentazione e modalità operative del trasferimento di nervi. [64]

È importante sottolineare come la chirurgia è necessaria, ma non sufficiente al completo recupero funzionale del paziente. Riabilitazione e rieducazione sono, infatti, fondamentali per prevenire rigidità e contratture articolari, ma anche per ottimizzare i risultati dell'operazione stessa. [65]





### 3. NEUROGUIDE

Nel capitolo precedente sono state presentate le migliori strategie cliniche per la gestione e la cura delle lesioni ai nervi periferici. Nonostante la loro efficacia sia stata ampiamente dimostrata, a queste sono associate numerose problematiche difficilmente superabili tramite le sole tecniche tradizionali: possono essere causa di rigetto, portare alla nascita di tumori e sono spesso legate alla disponibilità di tessuto adatto e donatori disponibili.

Infatti, l'innesto autologo, considerato *gold standard* per la riparazione delle lacune nervose, porta con sé criticità che non possono essere completamente ignorate come, per esempio l'inevitabile necessità di una seconda incisione, il sacrificio di un nervo sano e la conseguente perdita di sensibilità nell'area in cui il nervo viene prelevato. Anche le ulteriori tecniche descritte nel capitolo precedente comportano numerosi problemi intrinseci e inevitabili.

Sono dunque chiari i limiti della microchirurgia e delle tecniche tradizionali utilizzate nella riparazione delle lesioni nervose che, da un lato, sono necessarie per evitare danni irreparabili al soggetto affetto, ma non sufficienti a garantire un totale recupero del paziente.

#### 3.1 Ingegneria tissutale

Per cercare di ridurre al minimo gli effetti di un'operazione chirurgica o gli effetti collaterali dati dai farmaci, medicina e chirurgia devono essere affiancate da altre branche di ricerca scientifica. Tra queste spicca l'ingegneria tissutale, ovvero un campo di studi multidisciplinare che si avvale dei principi e dei metodi delle scienze biologiche, dell'ingegneria, della chimica e della fisica, per sviluppare dei sostituti artificiali di tessuti e organi danneggiati o rimossi, migliorarne le proprietà o favorirne la rigenerazione [45][66][67], eliminando così i problemi di immunocompatibilità.

Nel 1998 la Commissione Europea l'ha definita come “la rigenerazione dei tessuti biologici attraverso l'uso di cellule ottenute con l'aiuto di strutture di supporto e/o biomolecole” [67].

Per generare nuovi tessuti, l'ingegneria tissutale si sorregge su tre pilastri di fondamentale importanza: le cellule, gli *scaffold* e i fattori di crescita (non necessariamente vengono utilizzati contemporaneamente) [45][66][68].

Durante la fase di coltura le cellule non sono in grado di organizzarsi spontaneamente in una struttura tridimensionale e, dunque, necessitano di una struttura di supporto chiamata *scaffold*, che funga da supporto e permetta alle cellule di colonizzarlo e di produrre matrice extracellulare fino a quando il tessuto si rigenera. Lo *scaffold*, infatti, è una struttura tridimensionale che imita la struttura naturale del tessuto in cui le cellule crescono e si sviluppano, assistendo l'adesione, la proliferazione e la biosintesi cellulare, ma anche impedendo alle cellule “disturbanti” di

entrare nel sito di proliferazione [68]. Gli *scaffold* nella rigenerazione nervosa forniscono una struttura temporanea necessaria per la migrazione delle cellule di Schwann e la crescita degli assoni per poi essere sostituiti con cellule ospiti e matrice extracellulare [31].

Dal punto di vista dei materiali utilizzati nella loro fabbricazione, gli *scaffold* utilizzati in ingegneria tissutale possono essere:

- bioinerti: convivono con ambiente biologico senza causare reazioni avverse o rigetto;
- bioattivi: favoriscono interazioni dirette con l'ambiente biologico, favorendo la rigenerazione del tessuto;
- biorisorbibili: subiscono una progressiva degradazione senza provocare reazioni avverse. Questa decomposizione deve essere controllata per fare in modo che la loro struttura e funzioni rimangano inalterate durante tutto il processo di rigenerazione tissutale.

Dal punto di vista strutturale, inoltre, devono possedere proprietà meccaniche compatibili a quelle del tessuto originale che vanno a sostituire e presentare una porosità interconnessa controllata per favorire la semina, la migrazione, la sopravvivenza e lo sviluppo delle cellule, per favorire la formazione di vasi sanguigni e il trasporto di sostanze di scarto e per consentire il flusso di nutrienti, gas e liquidi tra le cellule e l'ambiente circostante. [45][68]

Nell'ingegneria dei tessuti biologici, infatti, la scelta del materiale è una considerazione importante e deve essere fatta tenendo conto di due proprietà: biofunzionalità, ovvero la capacità di riprodurre una determinata funzione sia dal punto di vista fisico che meccanico, e biocompatibilità, cioè la proprietà di non provocare reazioni avverse alla sua presenza [70]. Nella valutazione della biocompatibilità di una materiale ci si sofferma sulla sua resistenza ai processi di degradazione nell'organismo e gli effetti che i prodotti di tali processi hanno sui tessuti.

Tra le principali problematiche legate all'utilizzo dei biomateriali in ingegneria tissutale vi è la necessità di arginare il fenomeno della coagulazione che si verifica ogni qualvolta il sangue entri in contatto con una superficie diversa dall'endotelio dei vasi. Inoltre, per essere approvati dagli opportuni organismi (Food and Drug Administration (FDA)), prima della commercializzazione devono essere sterilizzabili senza subire cambiamenti nella loro struttura e caratteristiche. Tra le loro proprietà, dunque, oltre alla biocompatibilità (e biorisorbibilità, se necessario), vi deve essere la non-trombogenicità ed emocompatibilità, la resistenza alle alte temperature e la capacità di non assorbire sostanze sterilizzanti [70].

Infine, gli *scaffold* possono anche essere funzionalizzati, mediante fattori di crescita proteina che stimolano la proliferazione e la specializzazione delle cellule, che possono essere

incorporati direttamente, nel lume del condotto o attraverso un sistema di erogazione [31][67]. Alcuni di questi fattori sono il fattore di crescita dei nervi (BGF), il fattore neurotrofico derivato dal cervello (BDNF), il fattore di crescita simile all'insulina (*insuline-like growth factor*, IGF-1, IGF-2), i fattori di crescita derivati dalle piastrine (*platelet-Derived Growth Factor*, PDGF), il fattore di crescita dei fibroblasti (*fibroblast growth factors*, FGF) e il fattore neurotrofico ciliare (*ciliary Neurotrophic Factor*, CNTF). [79]

### 3.2 Neuroguide

Per superare le problematiche che accompagnano gli approcci terapeutici tradizionali per PNI, l'ingegneria tissutale è venuta incontro alla medicina sviluppando delle tecniche alternative meno invasive. La "tubulizzazione" mediante condotti di guida nervosi (*nerve guidance conduit*, NGC) (figura 3.1) ne è un esempio e si è dimostrata fin dai primi tentativi un'ottima alternativa agli innesti nervosi autologhi per facilitare e stimolare la ricrescita del tessuto nervoso periferico. La tecnica consiste nell'impegno di strutture cilindriche, tubolari, biocompatibili e di varia natura che vengono posizionate tra i due monconi di un nervo reciso presentante una lacuna.

L'analisi della letteratura ha evidenziato l'efficacia dei condotti nervosi per lesioni con perdite non superiori a 30 mm [72]. Il successo della rigenerazione nervosa in seguito alla tubulizzazione si deve alla formazione di uno scaffold di matrice extracellulare su cui vasi sanguigni, fibroblasti e cellule di Schwann migrano formando una nuova struttura nervosa.

Nel caso di lacune più lunghe di tre centimetri, è possibile che la rigenerazione fallisca a causa, per esempio, dell'incapacità delle cellule di Schwann di fornire un ambiente adatto all'allungamento assonale [72].

L'obiettivo è consentire al nervo di rigenerarsi attraverso uno spazio ben definito evitando la crescita interna di tessuto cicatriziale [33][40][45]. All'interno di questi condotti, dunque, il nervo in corso di rigenerazione può trovare protezione, supporto meccanico ed orientamento [45]; inoltre gli NGC, essendo dei sistemi tubulari chiusi, riducono la diffusione di fattori di crescita, fattori neurotrofici e chemioattrattivi, fondamentali per dirigere il cono di ricrescita assonale [72].

Per una rigenerazione nervosa di successo non è richiesta soltanto un'impalcatura che fornisca supporto meccanico e a prevenzione di tessuto cicatriziale all'interno del condotto, ma anche segnali biologici che indirizzino il cono di crescita assonale al moncone distale [44].

I recenti sviluppi nella fabbricazione delle neuroguide hanno portato alla funzionalizzazione di condotti capaci non solo di fornire una guida fisica, ma anche un rilascio dei fattori di

crescita e dei nutrienti per garantire la crescita degli assoni e la proliferazione/sopravvivenza delle cellule di Schwann [71]. Quindi, in altre parole, la guida degli assoni rigeneranti non è ottenuta solo da un effetto meccanico (la parete e il lume della guida nervosa), ma anche da un effetto chimico derivato dall'accumulo di fattori neurotrofici all'interno della guida stessa.

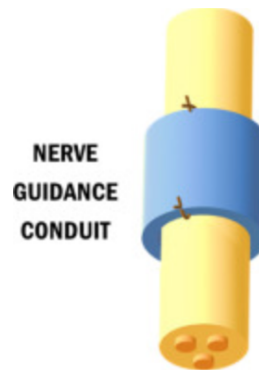


Figura 3.1: rappresentazione grafica di una neuroguida. [118]

### 3.2.1 Proprietà

Un condotto nervoso ideale deve presentare alcune proprietà: oltre ad essere facili da maneggiare e da suturare, devono essere facilmente disponibili e fabbricabili con design e dimensioni desiderate, impiantabili senza difficoltà e sterilizzabili senza perdita delle loro funzioni e senza l'assorbimento di agenti sterilizzanti. Inoltre, il condotto nervoso non deve essere immunogenico e, dunque, deve essere realizzato con materiali biocompatibili (e biorisorbibili), inerti o bioattivi in modo da promuovere la rigenerazione nervosa.

Per quanto riguarda le dimensioni degli NGC, lo spessore della parete del condotto, nel caso di un NGC biorisorbibile, è un fattore importante: nel caso in cui la parete sia eccessivamente spessa, il tempo di degradazione sarà particolarmente elevato, aumentando inevitabilmente le possibilità di rigetto; d'altra parte, invece, un NGC con pareti troppo sottili potrebbe subire una degradazione troppo veloce portando alla perdita delle sue funzioni prima del necessario. In generale, un tasso di degradazione troppo elevato può anche portare a gonfiore ed infiammazione, mentre un tasso di degradazione basso può causare il rigetto immunitario cronico. Lo spessore, inoltre, deve essere tale da non influenzare il processo di rigenerazione e tale da sopportare qualsiasi compressione del nervo senza provocarne la compressione. Anche il diametro interno del condotto è un fattore da tenere in considerazione per evitare di "strozzare" i due monconi e il nervo rigenerato. Sperimentalmente si è concluso che guide nervose con diametro interno di circa 1.5 mm e con spessore di 0.3 mm portano generalmente

ad ottimi risultati in termini di rigenerazione dei nervi periferici. La lunghezza dei condotti deve essere appropriata, in modo da permettere crescita del nuovo tessuto nervoso senza tensione. Anche la permeabilità è un fattore da non sottovalutare. Infatti, una buona permeabilità permette ai nutrienti, all'ossigeno e fattori di crescita provenienti liquido interstiziale (esterno al condotto) di diffondere all'interno del condotto favorendo la crescita assonale. Per massimizzare l'afflusso di ossigeno e nutrienti dal fluido interstiziale, è necessario utilizzare guide porose, con una corretta dimensione dei pori e grado di porosità. È necessario, però, che queste strutture siano impermeabili alle sostanze e cellule che ne rallentano la crescita. Lo studio condotto da Sarazin et al. nel 2004 [75] ha mostrato che la presenza di pori di dimensione maggiore di 20  $\mu\text{m}$  causa l'infiltrazione di fibroblasti; la dimensione ottimale dei pori per la guida nervosa dovrebbe essere compresa nell'intervallo di 5-30  $\mu\text{m}$  e preferibile nell'intervallo di 10-20  $\mu\text{m}$  [76].

L'afflusso di nutrienti aumenta con il diminuire dello spessore del condotto, ma un aumento della porosità o una diminuzione dello spessore portano inevitabilmente alla riduzione delle proprietà meccaniche della guida, compromettendo la capacità di affrontare le sollecitazioni di compressione. Dunque, le proprietà morfologiche devono essere attentamente analizzate durante la fase di progettazione dell'innesto: una buona NGC dovrebbe avere un grado di porosità superiore al 50% con un valore ottimale di circa il 70%; Le porosità superiori all'80%, invece, causano generalmente l'instabilità meccanica della guida. [76]

È possibile che le NGC attraversino un'articolazione o che i due monconi non siano sullo stesso piano/linea. Si necessita, dunque, di un'adeguata flessibilità per permettere loro di flettersi seguendo i movimenti dell'arto, ma abbastanza rigide da non raggiungere rottura. La rottura della guida, specialmente nelle fasi iniziali della rigenerazione, permette la formazione di tessuto fibroso al suo interno compromettendo, inevitabilmente, lo sviluppo del nervo rigenerante.

Anche le proprietà meccaniche devono essere adeguate, non solo per garantire il supporto strutturale, ma anche per imitare nel migliore dei modi possibile la matrice extracellulare.

La conduttività è un fattore importante nel caso di NGC costruiti in materiali conduttori. Negli scorsi capitoli è già stato ampiamente discusso il ruolo della stimolazione elettrica nei trattamenti alle lesioni ai nervi. A differenza dell'elettrostimolazione esogena, l'utilizzo di neuroguide con struttura interamente conduttrice consente di fornire la stimolazione direttamente allo scaffold; l'area sottoposta a ES è, dunque, quella intorno al condotto: ciò consente un miglior controllo spaziale del trattamento e, quindi, un miglioramento nella rigenerazione assonale e nella rimielinizzazione [44]. Attualmente l'utilizzo di polimeri

conduttivi nella fabbricazione di NGC non è particolarmente diffuso, probabilmente perché la maggior parte non sono biodegradabili. [44][45][72][73][76]

### 3.2.2 Design

In generale un condotto nervoso può essere progettato in diversi modi. In letteratura sono stati individuati cinque gruppi principali (figura 3.2)[40]: design cavo/non poroso (*hollow/non-porous design*), design multicanale (*multi channel design*), design poroso (*porous design*), design con riempitivi (fibra o hydrogel) (*with fiber/hydrogel fillers*), design scanalato (*grooved design*).

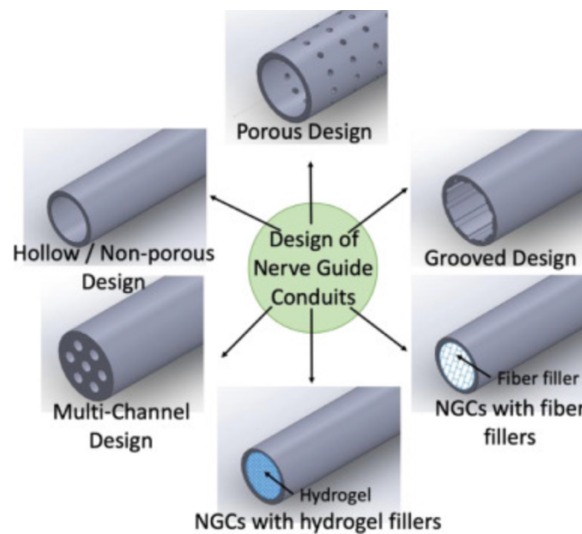


Figura 3.2: diversi design di condotti nervosi. [40]

Il modello più semplice di NGC è quello cavo/non poroso: consiste, infatti, in un tubo vuoto all'interno del quale il nervo può rigenerare e fornisce le funzioni di base delle NGC come, per esempio, isolamento degli assoni rigeneranti dal tessuto cicatriziale, protezione del nervo rigenerante contro la compressione da parte del tessuto circostante, guida direzionale longitudinale del tessuto rigenerante e concentrazione dei fattori di crescita secreti dalle cellule di Schwann nel lume del condotto. Nonostante siano NGC particolarmente semplici da produrre e da reperire, gli svantaggi nel loro utilizzo superano i vantaggi: poiché è un design non poroso, hanno una bassissima permeabilità ai nutrienti e ai fattori di crescita e a ciò si aggiunge l'assenza di fattori topografici per l'allineamento dei neuroni dal ceppo prossimale a quello distale. L'innesto di questi condotti, dunque, potrebbe addirittura limitare la formazione del nuovo tessuto al suo interno; infatti, studi sulla rigenerazione assonale in lacune superiori a 20 mm tramite NGC cave/non porose si sono conclusi con risultati poco soddisfacenti.

Per fare fronte a queste problematiche sono state studiate varie strategie per migliorare i segnali fisici e biologici all'interno delle NGC cave e, quindi, quindi migliorare la crescita dell'assone attraverso grandi lacune nervose.

Durante la rigenerazione nervosa gli assoni sviluppano espansioni della punta distale chiamati “coni di crescita” che esplorano l’ambiente circostante per rilevare i segnali di guida al processo di crescita. A loro volta i coni di crescita sviluppano ulteriori strutture chiamate “filopodi” e “lamellopodii” che interagiscono con l’ambiente extracellulare. L'adesione del cono di crescita e il fissaggio a una superficie solida sono necessari per la crescita dell’assone e, dunque, la microarchitettura dell'interno NGC sia un fattore cruciale per ottenere un'efficace crescita degli assoni attraverso un *gap* nervoso periferico indotto da lesioni [77].

Negli ultimi decenni NGC a design poroso sono stati valutati per il loro potenziale di sostenere la rigenerazione dei nervi periferici. Un’adeguata porosità, infatti, consente ai vasi sanguigni, all’ossigeno e ai fattori di crescita di permeare la struttura. Inoltre, la presenza di pori permette la migrazione delle cellule di Schwann dal tessuto nervoso adiacente che possono formare strutture allineate simili alle bande di Bungner. [77]

In commercio esistono anche NGC a design porosi con scanalature sulla superficie interna del condotto per facilitare l’allineamento direzionale dei neuroni. Tuttavia, data la loro geometria particolare sono difficili da fabbricare; il loro utilizzo, dunque, non è molto diffuso.

Le NGC a design multicanale imitano la struttura naturale dei nervi e contribuiscono a minimizzare la dispersione degli assoni. Inoltre, il design particolare comporta, da un lato, ad una maggiore estensione superficiale per la funzionalizzazione, l’adesione e la migrazione delle cellule rispetto alle NGC a singolo lume, ma dall’altro, riduce la permeabilità e la flessibilità meccanica.

Le NGC cave possono essere caricate con riempitivi per imitare il fascicolo nervoso. Infatti, l’architettura nativa nervosa consiste in una morfologia fascicolare allungata che consente la guida assonale dopo la lesione attraverso la formazione delle bande di Bungner, che forniscono una guida all’assone verso gli organi bersaglio. La ricerca, dunque, si è concentrata sullo sviluppo di NGC con riempitivi intraluminali che presentassero una struttura simile al loro interno. [80]

Questi riempitivi sono composti da elementi che promuovono lo sviluppo delle fibre e possono essere classificati in segnali biochimici e fisici. In termini di segnalazione biochimica, i riempitivi sono costituiti da fattori di crescita/neurotrofici, cellule di Schwann, acidi nucleici e molecole ECM come collagene, laminina e fibronectina. In termini di segnali fisici, invece, sono utilizzati filamenti e fibre [78]. Le proteine ECM contengono siti di attacco

riconosciuti dai coni di crescita assonale, dunque, è ovvio che l'inclusione di queste proteine favorisca la rigenerazione dei nervi. Per esempio, NGC di silicio diluiti riempiti di collagene o gel di laminina hanno promosso, infatti, una migliore rigenerazione nervosa attraverso spazi vuoti del nervo sciatico di 4-6 mm nei topi rispetto ai controlli. Inoltre, per consentire la rigenerazione nervosa in difetti superiori a 30 mm ei nervi peroneali del coniglio, i riempitivi luminali come le cellule di Schwann hanno dimostrato di restituire una crescita eccellente anche su spazi vuoti di 60 mm [78]. Infatti, è stato dimostrato il ruolo fondamentale nella rigenerazione del nervo periferico delle cellule di Schwann che, oltre ad offrire un ottimo substrato su cui migrano gli assoni, rilasciano anche di fattori bioattivi che migliorano la rigenerazione assonale. Per esempio, le cellule di Schwann producono molecole di ECM come collagene e laminina, che esprimono recettori di adesione cellulare, e secernono fattori neurotrofici (NGF, BDNF, CNTF). [79]

In generale, il riempitivo interno ad un NGC dovrebbe soddisfare i seguenti requisiti [76]:

- fornire i giusti segnali per l'adesione e la migrazione delle cellule di Schwann. Polimeri naturali che costituiscono la matrice extracellulare, come il collagene, o con una composizione simile ai componenti della matrice extracellulare, come gelatina e chitosano, possono interagire specificatamente con le cellule di Schwann;
- grado di porosità di circa il 60-80 % e una dimensione dei pori di 30-50  $\mu\text{m}$  per consentire la migrazione SC dalla prossimale all'estremità distale;
- biodegradabilità con un tasso di degradazione adeguato in modo da non ostacolare la rigenerazione del nervo;
- fornire una guida direzionale per migliorare ulteriormente il tasso di rigenerazione. Per questo motivo è consigliato l'uso di riempitivi basati su fibre allineate o dotati di canali orientati longitudinalmente. [40][45][76][77][78]

### 3.2.3 *Materiali*

Nell'ingegneria dei tessuti, la scelta del materiale è una considerazione importante e deve essere fatta tenendo conto di due proprietà: biofunzionalità, ovvero la capacità di riprodurre una determinata funzione sia dal punto di vista fisico che meccanico, e biocompatibilità, cioè la proprietà di non provocare reazioni avverse [70].

I condotti di prima generazione erano tipicamente realizzati in silicone o politetrafluoroetilene, ma, a causa della loro bassa degradabilità, all'incapsulamento fibrotico, a sindromi di compressione del nervo associate al condotto e a risposte patologiche croniche, i pazienti hanno



richiesto operazioni di rimozione. Inoltre, il silicone non è permeabile alle molecole di grosse dimensioni e, dunque, impedisce la corretta rigenerazione nervosa. [49][87]

I materiali utilizzati in ingegneria tissutale sono detti “biomateriali” e, a seconda della provenienza, sono classificati in naturali (eubiotici) o sintetici (xenobiotici) [69]. Quest’ultimi sono quelli maggiormente utilizzati nelle applicazioni di ingegneria tissutale: se da un lato i biomateriali naturali presentano alcuni vantaggi come il riconoscimento immunitario favorevole da parte del ricevente e la presenza di molecole strutturali e funzionali incorporate atte a promuovere l’adesione delle cellule [69][70], dall’altro l’elevata riproducibilità dei biomateriali sintetici, insieme al più facile accesso alla produzione su larga scala e la possibilità di fabbricarli su misura in modo da offrire un ampio spettro di proprietà controllabili (come resistenza, idrofobicità, struttura e tasso di degradazione), li ha resi una fonte attraente [67][69][70][81]. Generalmente i biomateriali di origine naturale sono biodegradabili e i loro prodotti di degradazione, rispetto a quelli sintetici, sono meno citotossici, maggiormente biocompatibili, più facilmente degradabili e metabolizzabili dai tessuti ospiti.

In generale, in ingegneria tissutale si è soliti miscelare polimeri naturali e sintetici o più polimeri sintetici, sfruttando i loro diversi vantaggi per migliorare le proprietà del materiale ottenuto. [40]

### *3.2.3.1 Biomateriali naturali*

I materiali a base naturale più studiati nell’ambito della rigenerazione nervosa sono poliesteri di origine naturale (poliidrossibutirrato e poliidrossivalerato), proteine (come collagene, gelatina, fibroina di seta, fibrina e cheratina) e polisaccaridi (come acido ialuronico, alginato, chitina e chitosano). Questi ultimi, però, se non miscelati con altri polimeri, non possiedono proprietà meccaniche sufficienti e, dunque, vengono generalmente utilizzati come riempitivi intraluminali [81]. Di seguito vengono descritti i biomateriali più importanti e le loro proprietà.

#### **Polisaccaridi**

**ACIDO IALURONICO (HA):** l’acido ialuronico è un glicosamminoglicano che compone la matrice extracellulare ed è costituito da unità ripetute di N-acetilglucosamina e da acido glucuronico. Può essere isolato da fonti naturali o prodotto per fermentazione batterica e può formare legami crociati con diverse molecole in modo da produrre veri e propri gel.

La molecola si può trovare a livello del liquido sinoviale delle articolazioni presentando ottime proprietà antiurto e lubrificanti. Permette, inoltre, di mantenere il tenore di idratazione, turgidità, elasticità e viscosità interponendosi nello spazio intracellulare e richiamando a sé numerose molecole d’acqua. [82]

L'utilizzo dell'HA nell'ingegneria tissutale è molto interessante in quanto è perfettamente biocompatibile, non antigenico, facilmente reperibile e modificabile e supporta la crescita assonale. Tuttavia, possiede proprietà meccaniche estremamente scarse anche se mescolato con altri biomateriali (come il chitosano). In vivo, infatti, l'HA subisce l'attacco dalla ialuronidasi compromettendone molto velocemente l'integrità strutturale.

HA, infatti, ha mostrato una degradazione molto rapida e non compatibile con i tempi richiesti per la riparazione dei nervi: condotti con struttura completamente in HA, dunque, sono inadatti per la guarigione delle PNI, ma le sue caratteristiche lo rendono efficace come riempitivo interno. [81]

**ALGINATO:** l'alginato è una molecola polimero di origine naturale composta da acido mannuronico e acido ulironico che può essere ricavata dalla parete cellulare di svariate alghe. È un materiale frequentemente utilizzato in ingegneria tissutale perché è biodegradabile, biocompatibile, sterilizzabile senza degradazione, facilmente modificabile tramite reazioni chimiche; inoltre, possiede una buona permeabilità ed è facilmente saturabile [81].

Le sue proprietà fisiche lo rendono adatto alla fabbricazione tramite molteplici tecniche e alla sua funzionalizzazione per il rilascio controllato di fattori di crescita per la rigenerazione nervosa.[81]

Come l'HA, l'alginato può reticolare con altre molecole per formare idrogel: infatti, generalmente viene utilizzato come composto intraluminale.

Nonostante i numerosi vantaggi, l'alginato mostra un alto tasso di degradazione e, quindi, viene spesso utilizzato con altri polimeri di origine naturale come il chitosano. [45][81][83]

**CHITINA E CHITOSANO:** la chitina è un omopolimero lineare costituito da N-acetilglucosamina, appartenente alla famiglia dei glicosamminoglicani. In natura è il polisaccaride più abbondante dopo la cellulosa ed è il principale materiale costituente dell'esoscheletro di crostacei ed insetti.

In ingegneria tissutale ha riscontrato successo la forma parzialmente deacetilata, il chitosano (figura 3.3), che può essere ottenuto dalla chitina attraverso idrolisi alcalina anche a basso costo. Il chitosano presenta proprietà favorevoli alla rigenerazione nervosa: oltre ad essere biocompatibile, biorisorbibile e bioattivo, riduce la formazione di tessuto cicatriziale, può essere lavorato attraverso molte tecniche a basso costo, è antiadesivo e antibatterico.

Inoltre, gli scaffold costituiti da questo materiale sono attraenti a causa della loro capacità di formare strutture porose interconnesse (struttura spugnosa).

Tramite il controllo del livello di acetilazione è possibile produrre dei condotti nervosi con diversi tassi di degradazione.

Un fattore che limita l'uso del chitosano, oltre all'alto tasso di degradazione, è la scarsa resistenza meccanica che, comunque, può essere migliorata con l'utilizzo di altri biomateriali.

Un esempio di condotto attualmente commercializzato a base di chitosano è Reaxon<sup>®</sup>, che consente di colmare lacune nervose fino a 26 mm e presenta proprietà come trasparenza, flessibilità e resistenza al collasso. [45][74][81]

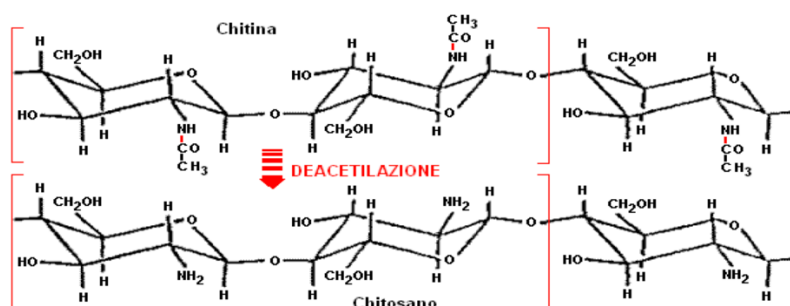


Figura 3.3: struttura molecolare di chitina e chitosano. [70]

## Proteine

### COLLAGENE:

il collagene è la principale proteina strutturale negli animali la più abbondante nei mammiferi ed è l'elemento primario della matrice extracellulare. Si trova nei tessuti che richiedono elasticità e flessibilità come, per esempio, da pelle, tendini e legamenti. In realtà, esistono 14 tipi di collagene, ma il più abbondante è quello di tipo I: la sua molecola è costituita da tre subunità peptidiche a formare il "tropocollagene". Le molecole di tropocollagene si assemblano in file parallele e sfalsate a formare le microfibrille di collagene. Questa struttura particolare, assieme ai legami la tengono assieme, conferiscono al collagene la proprietà più importante: la resistenza a trazione.

Inoltre, è stato dimostrato come questa molecola sia il substrato ideale per molti processi riparativi e rigenerativi. [67]

Il collagene è uno dei materiali maggiormente utilizzati in ingegneria biomedica grazie alle sue proprietà intrinseche: è altamente biocompatibile, resistente alla proteolisi, facilmente riassorbibile e compatibile con i polimeri sintetici. Inoltre, ha ottime proprietà emostatiche, è opportunamente modificabile tramite i suoi gruppi funzionali, ed è un ottimo veicolo per la somministrazione di farmaci.

NGC commerciali a base di collagene approvati dalla Food and Drug Administration (FDA) e dalla Conformity Europe (CE) sono:

- NeuraGen<sup>®</sup>: condotto nervoso costituito da collagene bovino di tipo I derivato dal tendine di Achille;
- RevolNerv<sup>®</sup>: condotto a base di collagene di tipo I derivato dalla pelle suina;
- Neuroflex<sup>®</sup>: realizzato con collagene di tipo I;
- NeuroMatrix<sup>®</sup>: realizzato con collagene di tipo III.

Per gli ultimi due condotti citati, in realtà, manca ancora la sperimentazione preclinica e clinica. [67][74][81][84]

#### GELATINA:

la gelatina è una sostanza ottenibile tramite denaturazione termica del collagene attraverso trattamenti termici ad alta temperatura o con acidi forti, base, o enzimi [86].

Quella di provenienza animale è stata ampiamente studiata grazie della sua biocompatibilità, plasticità e adesività. Rispetto al collagene è più economica e meno antigenica.

Questo materiale presenta un'elevata solubilità in acqua che ne determina l'aumento del tasso di degradazione e, quindi, la rapida perdita di struttura e funzioni. Per aumentarne la resistenza alla degradazione, la gelatina può essere combinata con altre molecole come collagene, fibrina, polimeri sintetici, ma anche con agenti di reticolazione come la genipina, proantocianidina e bisvinilsulfonemetile.

In generale, a causa dell'alto tasso di degradazione e della sua debole resistenza meccanica, NGC a base di gelatina sono state preparate utilizzando anche altri materiali come, per esempio, il chitosano.

Tuttavia, la cinetica di degradazione elevata permette alla gelatina di essere funzionalizzata con molecole bioattive in grado di promuovere la rigenerazione del tessuto. [81]

#### FIBROINA DELLA SETA:

in natura la seta viene filata dal baco da seta *Bombyx mori* e possiede notevoli caratteristiche come resistenza, lucentezza capacità di resistere all'usura. Tuttavia, a causa della denaturazione fotoindotta e della sua scarsa biocompatibilità non può essere utilizzata come biomateriale in ingegneria tissutale.

Attraverso una serie di trattamenti chimici, fisici e genetici è possibile ricavare la fibroina di seta (*Silk Fibrion*, SF) che presenta discreta lavorabilità, design strutturale controllabile, degradabilità appropriata, stabilità chimica e termica adeguata, è in grado di promuovere la

proliferazione delle cellule di Schwann. Dunque, si è rivelata efficace nel promuovere la crescita neuronale e l'orientamento delle fibre SF può guidare la direzione della crescita neuronale [86].

La sua composizione chimica, inoltre, influisce sul basso tasso di degradazione e le conferisce buone proprietà meccaniche come elasticità, flessibilità e alta resistenza alla frattura e alla compressione. L'utilizzo della seta nella pratica clinica per le suture chirurgiche, innesti arteriosi e valvole cardiache, non ha reso necessari ulteriori studi che dimostrassero l'ottima biocompatibilità della SF. [81]

La SF può anche essere miscelata con diversi biomateriali naturali o sintetici per migliorare le prestazioni del condotto e la sua biocompatibilità. Infatti, a causa della sua morbidezza, la fibroina di seta è raramente utilizzata da sola per realizzare scaffold mediante stampa 3D, ed è più spesso combinata con altri materiali per ottenere costrutti più resistenti. [84]

L'utilizzo della SF è economicamente vantaggioso rispetto ad altri materiali a base naturale: i processi di purificazione sono semplici e non costosi, è ampiamente disponibile e può essere lavorata sfruttando le infrastrutture dell'industria della seta.

Gli scaffold in SF possono essere sintetizzati in varie conformazioni come fibre, membrane, pellicole e hydrogel. Questa adattabilità può consentire la sua applicazione per il trattamento di diverse malattie neurodegenerative oltre alla riparazione delle lesioni nervose. [86]

Infine, studi in vitro e in vivo hanno dimostrato che la SF può essere degradata enzimaticamente senza indurre risposte infiammatorie o immunogeniche significative. [116][85]

Altre proteine come fibrina e cheratina sono state notevolmente studiate ed utilizzate in ingegneria tissutale per progettazione di NGC.

Poliesteri derivati da fonti naturali:

**POLIIDROSSIALCONATO (PHA)**

I poliidrossialconati (PHA) sono una classe di poliesteri di origine naturale utilizzati ingegneria tissutale. Hanno proprietà simili ai polimeri petrolchimici, ma sono prodotti tramite fermentazione batterica in condizioni di nutrienti limitati o in eccesso di fonti di carbonio. La produzione di PHA ha costi particolarmente elevati.

PHB (poli-3 idrossibutirrato) è quello più utilizzato in ingegneria tissutale per le sue proprietà: è biodegradabile, non tossico, biocompatibile [45]. Inoltre, NGC in PHB presentano eccellenti proprietà meccaniche e fisiche che possono anche essere facilmente modificabili con diverse tecniche. Il PHB presenta una certa cristallinità ed idrofobicità che gli conferiscono un tempo di degradazione in vivo di anni. Infatti, il PHB a contatto con l'ambiente biologico è in grado

di degradarsi naturalmente con tempi di riassorbimento sono particolarmente elevati (circa due anni). Nella pratica, dunque, si sono rivelati dei condotti stabili: ciò è sicuramente utile per le ricostruzioni nervose a lungo termine, ma potrebbe essere uno svantaggio per le applicazioni a breve termine.

L'utilizzo di NGC in questo materiale ha portato ad una buona rigenerazione nervosa, a bassi livelli di infiammazione, e a livelli di macrofagi paragonabili alle riparazioni con autoinnesto. I condotti in PHB sono stati utilizzati come sostituti alla riparazione epineurale diretta e per colmare lacune sia brevi che lunghe. Nel caso delle lacune più lunghe, la rigenerazione nervosa può essere migliorata funzionalizzando la struttura con fattori di crescita. [81][74][81]

### 3.2.3.2 Biomateriali sintetici

I polimeri sintetici sono un'ottima alternativa ai polimeri di origine naturale. Infatti, possiedono buone proprietà meccaniche, sono riproducibili su larga scala ed è possibile modificarne facilmente le proprietà durante il processo di fabbricazione, ma sono meno adatti a favorire la proliferazione cellulare rispetto a quelli di origine biologica.

Possono essere classificati in biomateriali sintetici non biodegradabili e biodegradabili.

I materiali sintetici non biorisorbibili utilizzati in passato sono il silicone e il politetrafluoroetilene espanso. Tuttavia, questi materiali presentano numerose problematiche legate alla loro bassa biodegradabilità in vivo; dunque, la ricerca è stata indirizzata verso nuovi materiali biodegradabili e maggiormente biocompatibili tra cui poliesteri come l'acido polilattico (PLA), acido poliglicolico (PGA) e il policaprolattone (PCL) e i loro copolimeri, il poli (acidocoglicolico lattico) (PLGA) o il polilattide-*co*-caprolattone (PLCL).

Di questa classe di poliesteri, solo PGA e l'acido poli-lattide-caprolattone (PLCL) sono stati sviluppati sotto l'approvazione della FDA, e sono disponibili in commercio come neuroguide (commercializzati come Neurotube<sup>®</sup>, synovisMCA, e Neurolac<sup>®</sup>, Regenity, rispettivamente).

Materiali sintetici non riassorbibili:

#### SILICONE

Uno dei primi materiali sintetici ad essere usato per NGC è il silicone, ma ha portato a solo una minima riparazione del nervo [87]. Infatti, le problematiche legate alle NGC in silicone di prima generazione come, per esempio la bassa degradabilità e la conseguente infiammazione cronica associata ad un'eccessiva formazione di tessuto cicatriziale, la bassa porosità a grandi molecole e la compressione dei gli assoni rigeneranti. [49][87]

#### POLITETRAFLUOROETILENE ESPANSO (ePTFE):

questo materiale è chimicamente identico alla sua forma non espansa, ma, dal punto di vista strutturale, è caratterizzato da una notevole porosità (è composto da oltre 1,4 miliardi di pori per centimetro quadrato [88]). Un prodotto a base di ePTFE utilizzato nella riparazione delle lesioni nervose è commercializzato sotto il nome di Gore-Tex®.

I condotti nervosi a base di questo materiale hanno portato ad una rigenerazione tissutale soddisfacente nel caso di piccole lacune, ma non per difetti più lunghi.

Come nel caso delle NGC a base di silicone, l'utilizzo di ePTFE comporta l'eccessiva formazione di tessuto cicatriziale, la compressione delle fibre rigeneranti e a risposte infiammatorie non irrilevanti. [87]

#### Materiali sintetici riassorbibili:

##### Poliesteri:

L'utilizzo dei poliesteri in ingegneria tissutale è diffuso grazie a buona biocompatibilità, biodegradabilità accettabile e lavorabilità in campo plastico [83]. Tuttavia, in generale gli scaffold a base di poliestere durante il processo di degradazione in vivo potrebbero causare un aumento dell'acidità nel sito di impianto attraverso il rilascio di prodotti di degradazione leggermente acidi [77].

#### ACIDO POLIGLICOLICO (PGA), ACIDO POLILATTICO (PLA), ACIDO POLI(LATTICO-CO-GLICOLICO) (PLGA):

il PGA è un materiale ampiamente conosciuto in ambito biomedico. Fa parte della famiglia dei poliesteri alifatici ed è ricavato tramite la polimerizzazione dell'acido glicolico [45]. È un polimero biodegradabile, rigido, termoplastico e altamente cristallino che presenta un modulo di trazione elevato con una solubilità molto bassa nei solventi organici. Ha una resistenza meccanica superiore ad altri polimeri biodegradabili [45] e presenta, dunque, proprietà meccaniche ideali per la fabbricazione di NGC, ma la sua resistenza meccanica può diminuire drasticamente e facilmente a causa della sua degradazione in ambiente biologico [74][85]. Infatti, è spesso utilizzato con successo come materiale di sutura biorassorbibile con un riassorbimento per idrolisi che avviene entro 90 giorni dall'impianto in vivo. Tuttavia, l'utilizzo di questo materiale per la costruzione di NGC può non portare a risultati soddisfacenti a causa della sua elevata velocità di degradazione; per questo motivo viene spesso utilizzato assieme ad altri biomateriali come chitosano e collagene [87]. Inoltre, i sottoprodotti derivati dalla sua degradazione hanno una natura acida e diminuiscono il pH nel sito di impianto limitandone

l'utilizzo. In caso contrario, l'acido derivato non può essere non può essere neutralizzato dal microambiente cellulare portando a risposte infiammatorie o, addirittura, a necrosi del tessuto [89].

È possibile utilizzare il PGA non solo come materiale strutturale delle NGC, ma anche come riempitivo intraluminale.

Neurotube® è il primo prodotto a base di PGA approvato dalla FDA e presenta caratteristiche come flessibilità, ondulazione, biorisorbibilità che lo hanno reso il condotto sintetico preferito in ambito chirurgico per le riparazioni di discontinuità nervose non superiori a 3cm [90].

L'acido polilattico (PLA) può essere ottenuto da acido lattico ottenuto da mais, barbabietola da zucchero o grano. Rispetto al PGA, il PLA è maggiormente a causa della presenza di un gruppo metilico nella catena laterale; dunque, il PLA presenta un tasso di degradazione maggiore rispetto al PGA con un minor rischio di effetti avversi e una maggiore resistenza alla degradazione, mantenendo la struttura inalterata più a lungo nel tempo [93]. Queste caratteristiche rendono il PLA più adatto all'uso del PGA nell'ambito della rigenerazione dei nervi periferici [63], ma in generale per tutte quelle applicazioni che richiedono maggiore durezza e rigidità [70].

Il prodotto derivato dalla copolimerizzazione dei due poliesteri descritti in precedenza, PGA e PLA, è l'acido poli(lattico-co-glicolico) (PLGA). Questo materiale è una scelta attraente per i dispositivi biomedicali non solo per la sua biocompatibilità, ma anche perché presenta proprietà fisiche variabili a seconda del grado di copolimerizzazione. Per esempio, il tasso di degradazione può essere regolato dal rapporto tra PLA e PGA: PLGA maggiormente ricchi di PLA sono meno idrofili e, quindi, si degradano con una velocità più lenta rispetto a PLGA ricchi di PGA. La degradazione può variare da due settimane per un rapporto 50:50, a più di sei settimane per un rapporto 85:15 (LA:GA) [92][94].

Sebbene i sottoprodotti di degradazione del PLGA, vale a dire l'acido lattico e l'acido glicolico, non siano tossici, sono altamente acidi e la metabolizzazione diventa difficile in grandi quantità. [40]

#### POLICAPROLATTONE (PCL):

il PCL è uno dei polimeri sintetici più comunemente utilizzati nella fabbricazione di neuroguide grazie alla sua biocompatibilità, facilità di produzione, bassi costi ed eccellenti proprietà meccaniche [45][63]. Si tratta di un poliesteri alifatico sintetizzato per la prima volta negli anni '30 a partire dalla polimerizzazione di  $\epsilon$ -caprolattone [91]. Inoltre, Il policaprolattone (PCL) offre biocompatibilità, biodegradabilità e stabilità strutturale. Ha un'eccellente flessibilità,



tenacità (a bassa temperatura), lavorabilità e compatibilità con altre sostanze [91]. Presenta una resistenza a trazione relativamente bassa e mostra un elevato allungamento a rottura.

Al fine di migliorare la rigenerazione sulle lacune più lunghe e critiche, il PCL può essere utilizzato assieme a agenti rigenerativi come fattori di crescita, piccole molecole, ma anche assieme ad altri biomateriali. L'inclusione di gelatina, per esempio, ha dimostrato di aumentare l'elasticità, il modulo di Young e la resistenza a trazione dei condotti [92].

Tuttavia, la sua degradazione molto lenta (2-4 anni) ne limita l'utilizzo, ma questo processo può essere velocizzato tramite la copolimerizzazione con PLA.

Rispetto ad altri composti, il PCL ha il vantaggio che i suoi composti di degradazione sono assolutamente atossici e non provocano alcuna risposta infiammatoria. [45][83].

#### POLILATTIDE-CO-CAPROLATTONE (PLCL):

PLCL è derivato dalla copolimerizzazione di monomeri di PLA e PCL combinando, dunque, caratteristiche di duttilità tipiche del PCL con la degradazione più rapida e la biocompatibilità del PLA.

Il polimero ha guadagnato interesse in ingegneria tissutale grazie alla sua facilità di fabbricazione e ai bassi costi di lavorazione. Ciò si deve alla sua deformabilità a temperature relativamente basse e alla sua solubilità in molteplici solventi organici.

Dal punto di vista proprietà meccaniche, il PLCL presenta una bassa resistenza a trazione accompagnata da allungamento a rottura elevato. [90]

La sua degradazione produce acido succinico, acido butirrico e acido valerico, che non sono tossici e non causano una risposta infiammatoria; in particolare sono meno acidi di quelli prodotti dalla degradazione di PLA causando, dunque, meno danno ai tessuti circostanti [90].

Tuttavia, la degradazione comporta inevitabilmente la perdita delle proprietà meccaniche del materiale. Come per il PLGA il tasso di degradazione può essere modificato rapporto dei suoi monomeri [90][94].

Questo materiale ha suscitato interesse anche per la sua trasparenza che è una caratteristica importante in ambito chirurgico perché può aiutare nella sutura del materiale. [90]

Un condotto nervoso realizzato in PLCL è Neurolac<sup>®</sup> che, attualmente, è l'unico dispositivo trasparente approvato dalla FDA e ha efficacia paragonabile all'innesto autologo fino a difetti di 20 mm. In alcuni casi, però, si sono riscontrate gravi reazioni da corpo estraneo, grave gonfiore, degradazione incompleta e collasso precoce del dispositivo. [90]



#### 4. NEUROGUIDE A BASE DI MATERIALI CONDUTTIVI

Nell campo delle guide neurali per la rigenerazione nervosa i polimeri a base naturale (per esempio chitosano, gelatina, alginato) assieme a quelli a base sintetica (per esempio PLA, PGA, PCL) costituiscono l'attuale classe dominante di materiali per la fabbricazione di NCG. Questi materiali sono promettenti a causa della loro lavorabilità, biocompatibilità, possibile biodegradabilità e proprietà meccaniche simili alla maggior parte dei tessuti naturali. Sebbene siano ampiamente adottati, questi materiali agiscono per lo più come un'impalcatura passiva in attesa che i tessuti nervosi si rigenerino naturalmente, ma non mostrano nessun supporto attivo per la proliferazione e differenziazione cellulare. [104]

Nel secondo capitolo di questa trattazione è già stato evidenziato il ruolo di una breve stimolazione elettrica (ES) a bassa frequenza nel promuovere la ricrescita del tessuto nervoso sia in seguito ad una riparazione con sutura diretta che con l'utilizzo di condotti nervosi conduttivi (figura 4.1) [49].

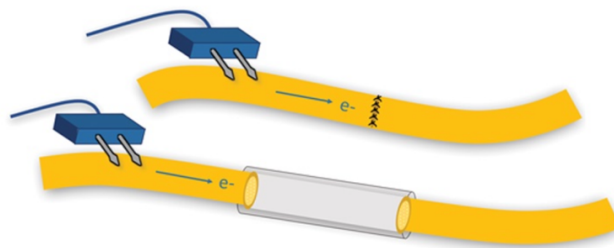


Figura 4.1: utilizzo di una breve stimolazione elettrica per promuovere la rigenerazione dei nervi sia nel caso di riparazioni dirette end-to-end, sia nel caso dell'utilizzo di condotti nervosi elettricamente conduttivi [49]

È stato dimostrato, infatti, che stimoli come stretching, compressioni o, appunto, una stimolazione elettrica, siano in grado di guidare la differenziazione cellulare e innescare percorsi di segnalazione. La cellula è in grado di percepire stimoli fisici dall'ambiente circostante grazie a dei sensori sensibili a stimoli meccanici come deformazione, forza o tensione, presenti sulla membrana cellulare o all'interno della cellula stessa. Rilevando questo stimolo, iniziano un processo complesso noto come trasduzione del segnale attraverso cui il segnale viene convertito in risposte biochimiche all'interno della cellula.

Queste tecniche, dunque, si sono dimostrate utili nel recupero di tessuti danneggiati. [95]

Un approccio maggiormente efficace rispetto al solo utilizzo di NCG con materiali descritti nei capitoli precedenti è l'uso combinato di condotti e stimolazione elettrica. Tuttavia, affinché la stimolazione elettrica raggiunga direttamente i tessuti bersaglio, il condotto nervoso deve essere fatto di materiali elettricamente conduttivi.

Inoltre, anche l'utilizzo di scaffold elettroattivi senza l'utilizzo di ES è in grado di promuovere la ricrescita nervosa. [104]

L'uso di biomateriali conduttivi per la progettazione di NGC di nuova generazione su cui applicare una stimolazione elettrica esterna rappresenta un'area di ricerca fortemente in crescita. In questo modo i condotti non forniscono solo supporto strutturale, ma anche segnali elettrici fortemente localizzati ai nervi rigeneranti consentendo, dunque, il trasporto della carica all'interfaccia cellula-substrato. Inoltre, questo tipo di materiali hanno attirato sempre più attenzione anche per il loro ruolo di modulatori dei comportamenti e la funzione delle cellule/tessuti, specialmente per le cellule e i tessuti elettricamente eccitabili. [97]

#### **4.1 Biomateriali conduttivi**

I biomateriali conduttivi possono essere classificati in tre diverse categorie [97] (figura 4.2):

- biomateriali a base di carbonio: quelli maggiormente utilizzati in ingegneria tissutale sono i materiali a base di grafene e nanotubi di carbonio (CNT). Questi materiali vengono comunemente utilizzati come materiale di rinforzo per aumentare le prestazioni meccaniche e la conduttività di matrici polimeriche. Inoltre, presentando ampie superfici e abbondanti gruppi funzionali possono essere utilizzati per il carico e il rilascio di specie bioattive, come farmaci, fattori di crescita, geni e proteine;
- ossidi di metallo/metallo: particelle metalliche possono essere utilizzate come biomateriali conduttivi, tra cui nanoparticelle di oro (AuNM), argento e rame. Questi materiali mostrano una biocompatibilità e biodegradabilità e sono pensati per migliorare la conduttività elettrica e la rigidità degli scaffold ingegnerizzati. In generale, i metalli sono perfettamente biorisorbibili e i prodotti della loro degradazione sono completamente innocui a livello molecolare. All'interno del corpo, però, possono essere soggetti a corrosione e i sottoprodotti di questo processo possa causare necrosi dei tessuti circostanti. [41]

Inoltre, presentano superfici elevate e facilmente modificabili. Per questo motivo possono essere funzionalizzate per il rilascio di farmaci;

- polimeri conduttori: oltre ad essere elettricamente conduttivi, presentano anche proprietà tipiche dei polimeri comuni come, per esempio, flessibilità e bassa rigidità. Questi materiali sono facilmente modificabili e ciò consente di personalizzare le varie proprietà degli scaffold rendendoli un'opzione attraente per i componenti conduttivi negli scaffold elettroattivi.

I tipici polimeri conduttori comunemente usati in campo biomedico, tra cui polipirrolo (PPy), polianilina (PANi), politiofene (PTh), poli(3,4-etilenediossitiotofene) (PEDOT).

Nelle pagine successive verranno approfondite le proprietà e le applicazioni di questi polimeri nell'ambito della fabbricazione di neuroguide.

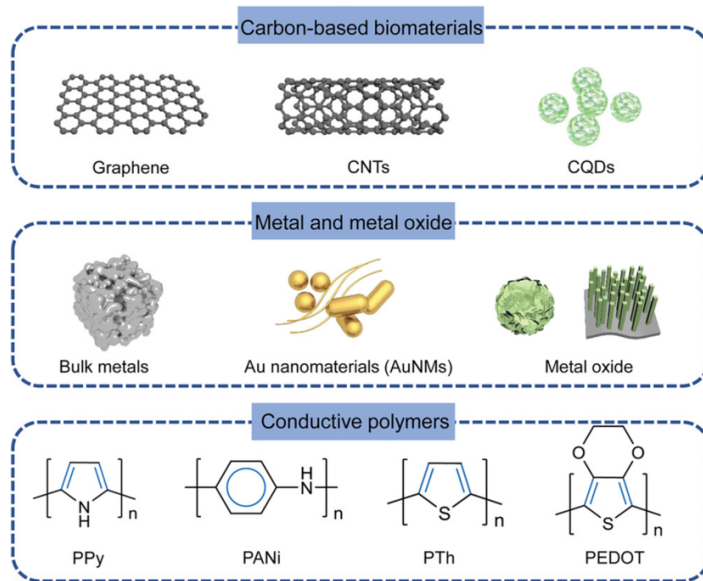


Figura 4.2: classificazione dei biomateriali elettricamente conduttivi tipicamente utilizzati in ingegneria tissutale. [97]

## 4.2 Polimeri conduttori:

I polimeri conduttori, chiamato anche “polimeri coniugati”, sono polimeri che, oltre a possedere le proprietà meccaniche tipiche dei materiali polimerici, possiedono anche proprietà elettriche intrinseche che li rendono in grado di condurre corrente elettrica.

Lo studio dei polimeri conduttori è partito accidentalmente nel 1977 in Giappone nel tentativo di sintetizzare il poliacetilene, un polimero che normalmente è solo semiconduttore, ma se esposto a vapori di bromo o iodio aumenta di 10 milioni di volte la sua conduttività (da  $10^{-4}$  S/cm a  $10^2$  S/cm [102]) passando a stato di conduttore. Involontariamente si era appena svolto un trattamento di “doping” senza il quale questi materiali non presenterebbero la caratteristica capacità di condurre elettricità. Tuttavia, questo polimero era particolarmente difficile da sintetizzare e mostrava instabilità a contatto con l’aria; dunque, le ricerche furono indirizzate verso polimeri migliori. La scoperta fu eclatante in quanto i polimeri fino ad allora studiati avevano mostrato solo proprietà isolanti. [99][100][101]

### 4.2.1 Meccanismo di conduzione

In generale, l’origine della conduzione elettrica nei polimeri conduttori si deve alla formazione di difetti non lineari all’interno del reticolo del polimero formati durante il doping o la polimerizzazione di un monomero. [103]

L'alta conduttività di questi polimeri si deve a due fattori:

- 1) coniugazione  $\pi$ : i polimeri conduttori presentano una catena coniugata, quindi caratterizzata dall'alternanza tra legami singoli e doppi lungo la catena polimerica principale (figura 4.3). Il legame singolo di tipo  $\sigma$  è chimicamente forte e localizzato, mentre i legami doppi contengono anche un legame  $\pi$  con il quale gli elettroni vengono condivisi sopra e sotto il piano della catena principale. Questa condivisione di elettroni lungo la catena crea una sorta di "struttura strada" per gli elettroni, permettendo loro di muoversi liberamente lungo la catena stessa contribuendo alla conduzione della carica elettrica attraverso il polimero. [100]

C'è da specificare che la coniugazione  $\pi$  non rende il sistema un conduttore, bensì un semiconduttore. Per arrivare alle conducibilità tipiche dei conduttori è necessaria un ulteriore fattore: il *doping*.

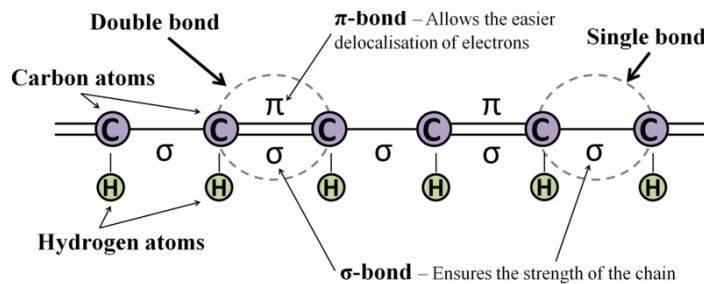


Figura 4.3: rappresentazione semplificata della spina dorsale coniugata tipica dei polimeri conduttori. si noti l'alternanza tra legami di tipo  $\sigma$  e di tipo  $\pi$ . [100]

- 2) *doping*: Il doping è il processo di ossidazione (p-doping) o riduzione (n-doping) di un polimero neutro tramite l'aggiunta di un agente drogante [101]. Essenzialmente, questo processo modifica il numero di elettroni nel polimero.

Per questo motivo il termine "*doping*" è improprio perché si tratta di una vera e propria reazione di ossidoriduzione.

L'agente drogante, in particolare, oltre a neutralizzare la spina dorsale instabile del polimero ossidato [103], introduce un vettore di carica in questo sistema rimuovendo o aggiungendo elettroni dalla/alla catena polimerica e rilocalizzandoli come polaroni, un elettrone liberamente tenuto, ma localizzato, circondato da distorsione del reticolo. L'applicazione di un potenziale elettrico determina un'entrata o un'uscita dalla spina dorsale del polimero rendendola, dunque, instabile. In questo modo, il polarone può viaggiare lungo la catena polimerica, permettendogli di condurre l'elettricità. [100] (figura 4.4)

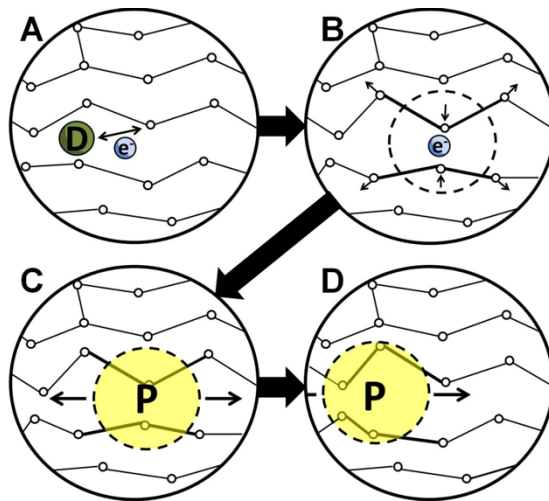


Figura 4.4: effetto dell'agente drogante sulla catena polimerica: (A) il drogante aggiunge o toglie un elettrone dalla catena creando una carica delocalizzata; (B) questa carica è circondata da una distorsione del reticolo cristallino (polarone); (C) e (D) applicando un campo elettrico il polarone può viaggiare lungo la catena polimerica permettendogli di condurre elettricità. [100]

Il processo di doping avviene durante la sintesi e può essere effettuato chimicamente, elettrochimicamente o tramite fotodoping. Inoltre, maggiore è la quantità di agente drogante, maggiore è la conduttività raggiunta dal polimero. [100]

#### 4.2.2 Proprietà

Precedentemente è già stato accennato che i polimeri conduttivi offrono molti vantaggi rispetto ad altri materiali utilizzati comunemente come, per esempio, la conduttività. Tuttavia, è di fondamentale importanza che questa proprietà sia adeguata. Scaffold eccessivamente conduttivi potrebbero innescare la morte cellulare, poiché le cellule riceverebbero correnti superiori alla loro soglia di sopravvivenza. Sistemi insufficientemente conduttivi, invece, potrebbero causare il surriscaldamento del sito di innesto e, quindi, morte cellulare a causa della denaturazione proteica. [104]

Come descritto nei capitoli precedenti, in un buon condotto nervoso proprietà come biocompatibilità, biodegradabilità, porosità, geometria tridimensionale e flessibilità sono fondamentali.

Molti polimeri conduttori sono cristallini e, dunque, presentano una porosità limitata. [101]

Nel caso di biocompatibilità insufficiente, inoltre, è possibile legare ai polimeri molecole, segmenti e catene laterali biocompatibili. [100]

In generale, un grande vantaggio dei polimeri conduttivi è che le loro proprietà possono essere facilmente modificabili, ottimizzabili e adattabili ad esigenze particolari incorporando specifiche molecole attraverso il legame di biomolecole biologicamente rilevanti. [100]

Nonostante i molteplici vantaggi dei polimeri conduttori tra cui la conduttività, biocompatibilità, capacità di intrappolare e rilasciare in modo controllabile le biomolecole, una limitazione intrinseca che rimane è la loro incapacità di subire una facile biodegradazione in vivo.

#### 4.2.3 Materiali

I polimeri conduttori che hanno mostrato maggiore interesse per la fabbricazione di neuroguide sono il polipirrolo (PPY), la polialanina (PANI) e il Poli(3,4-Ethylendioxythiophene) (PEDOT) la cui struttura molecolare è rappresentata nella figura seguente (figura 4.5). [40][45][100][101][103][104][105][106][107]

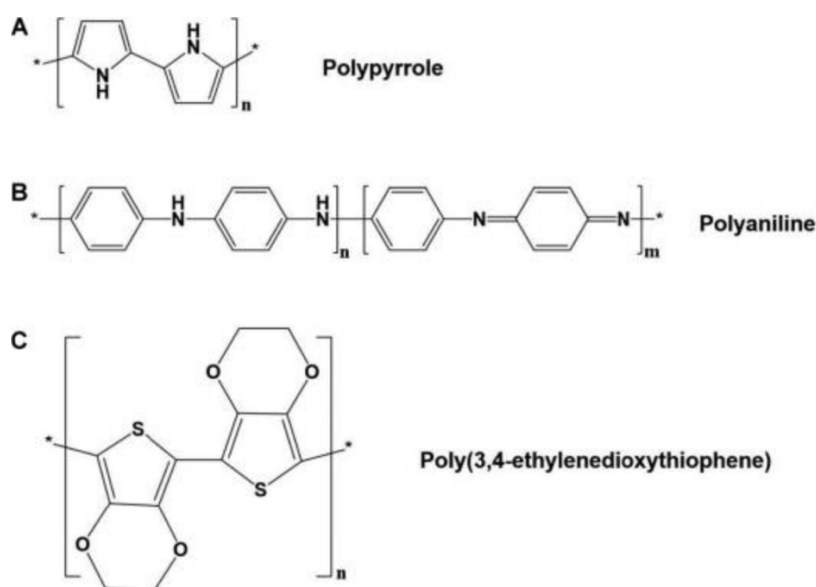


Figura 4.5: struttura molecolare di PPY, PANI e PEDOT.

##### 4.2.3.1 Polipirrolo (PPY):

Il polipirrolo (PPY) è uno dei polimeri conduttivi maggiormente utilizzati come biomateriale nell'ingegneria dei tessuti neurali e presenta molte applicazioni anche in altri settori come nello sviluppo di batterie ad alta tensione, biosensori e sistemi di somministrazione di farmaci. La conduttività dei film PPY può essere raggiunta fino a circa  $10^3$  S/cm, a seconda del tipo e della quantità di drogante. [110]

Il suo successo si deve, oltre ad una conduttività adeguata in condizioni fisiologiche, alla sua biocompatibilità sia in vivo che in vitro e stabilità chimica sia nell'aria che nell'acqua. Inoltre,



è facile da sintetizzare [109] e può essere fabbricato facilmente e in modo flessibile a temperatura ambiente e in molti solventi come, per esempio, l'acqua.

La biocompatibilità del PPY è stata dimostrata da Wang et al. [108] sia in vitro che in vivo. Nell'esperimento in vitro i gangli della radice dorsale di ratti Sprague-Dawley sono stati coltivati su una membrana di PPY, mentre in vivo è stato collocato un condotto PPY-silicone (membrana PPY sulla superficie interna del tubo di silicone) per colmare un divario di 10 mm del nervo sciatico dei ratti. In entrambi i casi il polimero non era stimolato da ES.

Ventiquattro settimane dopo l'intervento chirurgico il PPY non ha mostrato segni di tossicità né in vivo né in vitro. Inoltre, i gruppi trattati con PPY hanno mostrato un tasso di proliferazione delle cellule di Schwann migliore rispetto al gruppo di controllo.

Anche la scelta del drogante nel polimero deve essere fatta meticolosamente a causa della sua interazione con la cellula e il corpo per evitare tossicità inaspettata (figura 4.6) [107].

Dunque, è stato osservato che gli scaffold di polipirrolo sono in grado di sostenere l'adesione delle cellule di Schwann, la sopravvivenza, la migrazione e la proliferazione e la crescita dei neuriti.

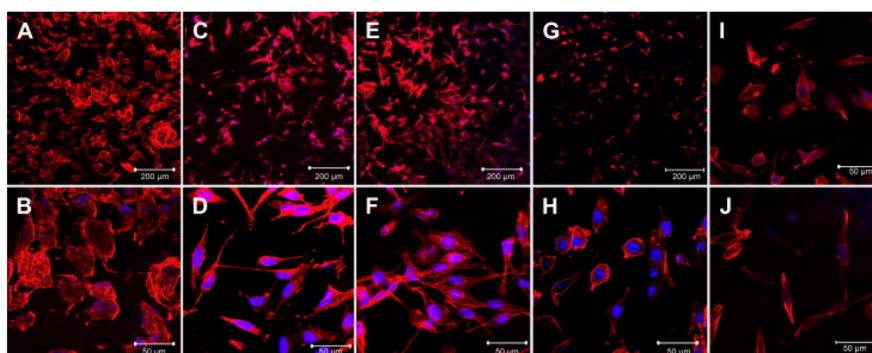


Figura 4.6: comportamento delle PC12 coltivate su scaffold conduttivi PCL-PPY con droganti diversi. Si noti che la proliferazione cellulare è stata influenzata dal tipo di drogante utilizzato nella sintesi del polimero conduttore. [107]

Inoltre, è possibile produrre questo polimero con diversi livelli di porosità e può essere facilmente adattato agli utilizzi in campo biomedico tramite l'integrazione di molecole bioattive.

A causa della sua struttura molecolare, però, il PPY è molto difficile da lavorare una volta sintetizzato: è meccanicamente rigido, fragile e insolubile dopo la sintesi. [110]

Uno dei maggiori svantaggi è la sua assente biodegradabilità, anche se è possibile avere dei leggeri miglioramenti incorporando nella struttura di PPY polimeri sintetici come PLA, PGA e PLGA.

Considerando questi svantaggi, quindi, sono necessarie ulteriori ricerche per confermare l'affidabilità dell'utilizzo del PPY come materiale per scaffold per la rigenerazione nervosa. [109][100][105]

Xu et al. [109] hanno sintetizzato un condotto nervoso composito conduttivo di PPY e PLA per cercare di superare le principali carenze che il PPY ha in ingegneria tissutale tra cui la scarsa biodegradabilità. La scelta del PLA come materiale è stata fatta considerando le sue promettenti proprietà come l'ottima biocompatibilità, biodegradabilità e proprietà meccaniche.

L'obiettivo dello studio era valutare la capacità del condotto di sostenere la differenziazione delle cellule di PC12 di ratto *in vitro* e determinare la sua capacità di promuovere la rigenerazione dei nervi *in vivo* nel caso di stimolazione elettrica con 100 mV per due ore.

L'analisi è stata effettuata su condotti sintetizzati con diverse percentuali di PPY (5%, 10%, 15%) e quindi con diverse conduttività (5,65, 10,40 e 15,56 mS/cm, rispettivamente) (figura 4.7) [109].

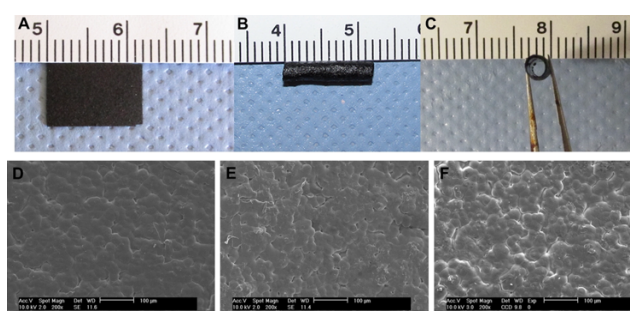


Figura 4.7: A) Immagine del film PPY/PDLLA. B) e C) Immagine del condotto nervoso PPY/PDLLA. D), E) e F) micrografie SEM della morfologia superficiale del 5%, 10% e 15% PPY/PDLLA, rispettivamente. [109]

Si è osservato che:

- le cellule stimolate elettricamente hanno mostrato neuriti più lunghi rispetto ai gruppi di controllo non stimolati con lunghezza crescente all'aumentare del contenuto di PPY;
- un aumento della percentuale di cellule portanti di neurite;
- i risultati ottenuti in seguito l'utilizzo del condotto PPY/PLA per la riparazione del nervo sciatico dei ratti sono molti simili a quelli derivate da riparazioni con innesto autologo.

Inoltre, dal punto di vista della biodegradabilità, il condotto ha mostrato risultati soddisfacenti (Figura 4.8): dopo tre mesi dall'innesto, il condotto diventa sottile e nitido mantenendo, però, l'integrità strutturale e del lume, dopo sei mesi la degradazione è quasi totale, ma accompagnata da una significativa rigenerazione nervosa.

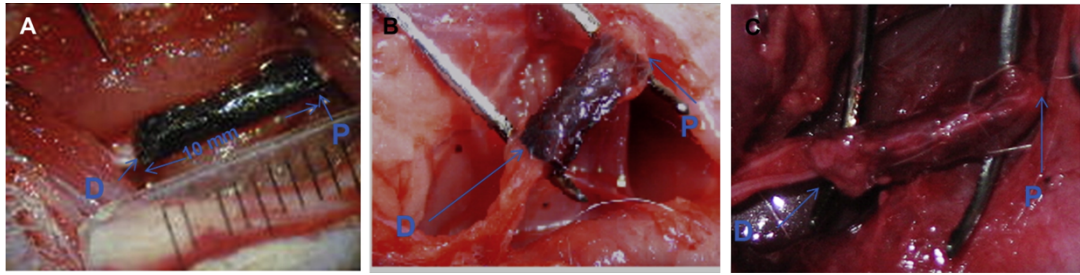


Figura 4.8: fotografie intraoperatorie del condotto PPY/PLA. (A) condotto appena innestato, (B) sito di riparazione dopo tre mesi dall'innesto, (C) sito di riparazione dopo sei mesi dall'innesto. [109]

#### 4.2.3.2 polianilina (PANI):

La polianilina (PANI), nota anche come “anilina nera” [100], è il secondo polimero conduttore maggiormente studiato. Viene spesso utilizzata nella fabbricazione di sensori di gas, condensatori ad alte prestazioni, batterie e nei tessuti di cotone come un modo per fornire protezione dalle radiazioni UV.

Ha riscosso successo in ingegneria tissutale grazie a proprietà uniche che supportano l'adesione e la proliferazione cellulare, tra cui l'elevata conducibilità elettrica, l'elevata stabilità ambientale e termica, facilità di sintesi e preparazione e biocompatibilità [107]. Diversi studi hanno valutato la risposta in vivo degli impianti a base di PANI: la presenza del polimero non ha portato ad un'inflammation significativa nel sito di impianto, ma si è osservata comunque una debole presenza di cellule immunitarie (mastociti) ed un sottile tessuto fibroso incapsulante l'impianto [101].

Oltre a questi vantaggi, PANI presenta un basso costo di produzione e la capacità di passare elettricamente tra i suoi stati conduttivi e resistivi mediante il processo di doping/de-doping [100][110].

Inoltre, secondo alcuni rapporti il PANI ha una corretta funzione antibatterica, specialmente per il batterio Gram-positivo [106].

Tuttavia, la sfida principale per l'utilizzo della PANI e dei suoi derivati in applicazioni biomediche deriva dalla sua scarsa compatibilità cellulare, bassa lavorabilità, mancanza di flessibilità e di biodegradabilità, ed è stato notato che causa un'inflammation cronica una volta impiantato [100]. Queste problematiche possono essere affrontate attraverso la miscelazione o l'innesto di altri biomateriali collagene e chitosano [107].

Nello studio di Wang et al. [111] è stata valutata l'efficacia riparatrice di un condotto nervoso in zeina, una proteina appartenente al gruppo delle prolamine, con microtubi intraluminari rivestiti superficialmente con PANI, in modo da dotare il condotto di conduttività per sostenere

la rigenerazione nervosa. L'obiettivo era colmare un difetto di 10 mm nel nervo sciatico del ratto.

La citocompatibilità del rivestimento polimerico conduttivo è stata valutata utilizzando cellule PC12 e cellule NIH 3T3: i risultati hanno indicato che la vitalità e il numero di cellule erano più alti nel caso di utilizzo di rivestimento in PANI rispetto ai gruppi di controllo.

L'analisi superficiale tramite SEM e TEM dei microtubi ha portato a dire che il rivestimento non ha influenzato il loro spessore e la porosità (figura 4.9). Infatti, le porosità dei microtubi di zeina con e senza rivestimento PANI erano rispettivamente  $81.44 \pm 1.80\%$  e  $81.96 \pm 1.46\%$ .

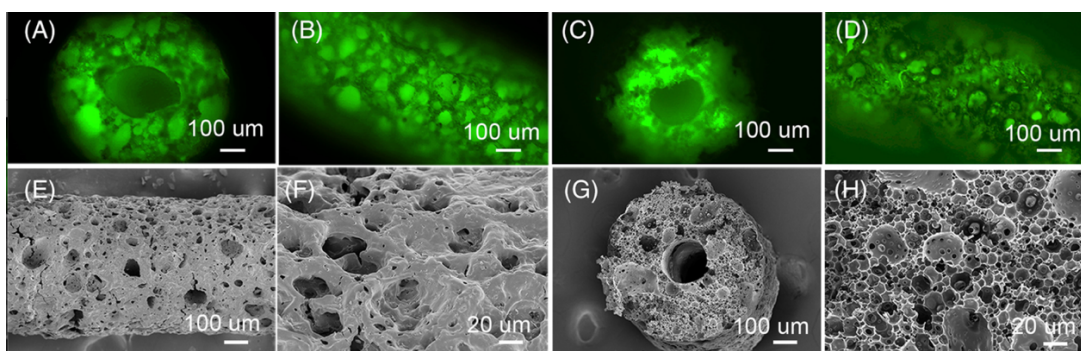


Figura 4.9: struttura dei microtubi con e senza rivestimento di PANI osservata tramite microscopio a fluorescenza (A-D) e SEM (E-H). [111]

Il rivestimento con questo polimero conduttore ha aumentato la conduttività del condotto da 0.016 S/cm a 0.030 S/cm e, dunque, questo sistema ha dimostrato di essere in grado di promuovere con successo la rigenerazione e il recupero funzionale del nervo nella fase iniziale post-trapianto (2 mesi), raggiungendo un'efficacia riparatrice paragonabile all'autoinnesto.

Tuttavia, dopo quattro mesi, l'effetto riparatore è venuto meno probabilmente a causa della perdita di struttura del condotto. Il rivestimento di PANI si è frammentato per formare detriti all'interno o intorno ai nervi rigenerati e i microtubi degradati completamente. Tuttavia, le particelle di PANI non degradabili possono indurre una risposta infiammatoria e, dunque, influenzare la rigenerazione del tessuto nervoso in vivo.

È importante specificare se ha risposta infiammatoria solo con la degradazione della PANI. Tale rischio è pressoché nullo se il rivestimento rimane integro sotto forma di film intatto.

[111]

#### 4.2.3.3 Poli(3,4-etilenediossitiolfene) (PEDOT):

Un terzo polimero coniugato molto promettente fortemente utilizzato in ambito industriale, commerciale e biomedico, è il PEDOT.

Il PEDOT, un derivato del politiofene (PTh), è ottenuto tramite polimerizzazione chimica o elettrochimica di monomeri di EDOT. Nel corso degli ultimi anni del secolo scorso questo materiale ha acquisito sempre maggiore popolarità grazie alle sue particolari caratteristiche. [114]

Studi recenti condotti su film di PEDOT hanno messo in evidenza la sua buona biocompatibilità e non tossicità per una vasta tipologia di cellule, tra cui le cellule neuronali [114]. In realtà, alcuni studi che hanno messo in evidenza una leggera citotossicità del materiale, ma la risposta infiammatoria conseguente non è particolarmente rilevante. [100]

La sua struttura molecolare gli garantisce una buona stabilità elettrica e chimica, e una migliore conduttività e stabilità rispetto ad altri polimeri conduttivi come, per esempio, il polipirrolo [100]. Nello stato drogato il PEDOT presenta una conducibilità di circa 550 S/cm. [114]

È un polimero biocompatibile, trasparente e altamente conduttivo le cui proprietà di conduzione elettrica sembrerebbero rimanere inalterate anche dopo l'invecchiamento in condizioni ambientali [113], ma presenta una scarsa biodegradabilità. Inoltre, la sua elevata flessibilità e compatibilità meccanica con i tessuti lo rende utile alla progettazione di dispositivi impiantabili per tessuti biologici morbidi ed estensibili. [112][113][114]

Nel campo dell'ingegneria dei tessuti è maggiormente nota una forma di PEDOT più complessa: Poli(3,4-etilenediossiofene):poli(stirololo solfonato) (PEDOT:PSS) la cui struttura chimica è riportata nella figura sottostante (figura 4.10)

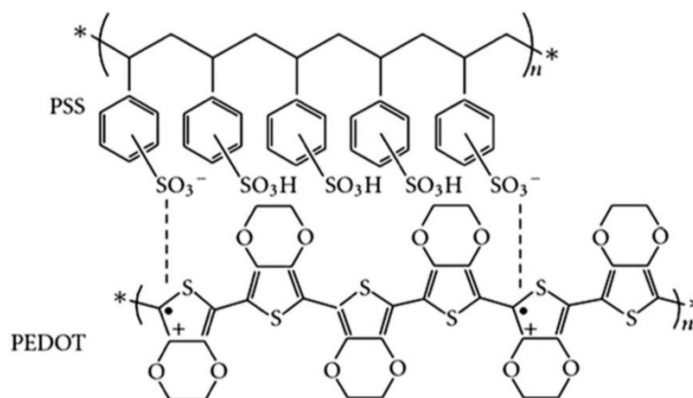


Figura 4.10: struttura chimica del PEDOT:PSS. [115]

Generalmente i rivestimenti in questo materiale presentano un'elevata stabilità termica fino a 200 °C, oltre i quali si verifica l'evaporazione del PSS ed inizia il decadimento del materiale. Inoltre, la conducibilità di questo polimero dipende solo ed esclusivamente dal PEDOT e diminuisce notevolmente se esposto alla luce. Per questo motivo il suo utilizzo in ambienti esterni è sconsigliato. Tra le proprietà più importanti di questo materiale vi è l'elevata

flessibilità che, tuttavia, è fortemente influenzata dal livello di umidità dell'ambiente in cui è collocato.[114]

Un condotto di fibroina di seta (SF) combinato con nanoparticelle di PEDOT (PEDOT NP) progettato da Escobar et al. [116] ha mostrato proprietà ottimali per la riparazione del nervo periferico sia dal punto chimico-fisico che dal punto biologico: presenta eccellenti proprietà meccaniche, di conduzione elettrica e di biocompatibilità.

Le nanoparticelle di PEDOT rispetto al PEDOT:SSP offrono numerosi vantaggi, tra cui la funzionalizzazione superficiale su misura, maggiore conduttività elettrica e anche la capacità di essere dispersi in sistemi a base d'acqua come gli hydrogel.

Sono stati presi in considerazione condotti senza PEDOT NF (controllo) e con PEDOT NP a concentrazioni diverse, in particolare a 1 %, 5 % e 10 %. Oltre a questi, è stato preparato un condotto in SF imbevuto (*soaked*) con una soluzione di PEDOT NP. (figura 4.11)

La presenza di PEDOT nei condotti di SF è facilmente osservabile ad occhio nudo: più è scuro il condotto, maggiore è la concentrazione di polimero.

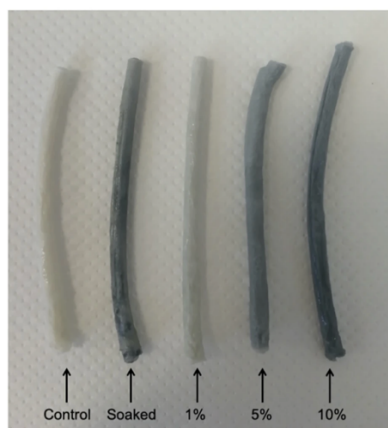


Figura 4.11: condotti SF/PEDOT NP utilizzati nello studio di Escobar et al. [116]

Tutti condotti presentano uno spessore di circa 400  $\mu\text{m}$  e un diametro totale di circa 2.5 mm.

Inoltre, le immagini SEM mostrano una struttura porosa altamente interconnessa in tutti i condotti che è fondamentale per garantire lo scambio di nutrienti e rifiuti e per la penetrazione di vasi sanguigni.

Proprietà meccaniche adeguate sono importanti per garantire il corretto funzionamento delle guide nervose: i condotti nervosi non dovrebbero sovraperformare le proprietà meccaniche dei nervi periferici stessi in quanto ciò causa un'elasticità discontinua tra il condotto e la crescita del nuovo tessuto e devono essere in grado di allungarsi. Inoltre, i muscoli adiacenti esercitano carichi sui nervi e, in posizione di riposo, i nervi sono sollecitati a trazione.

Tramite prove di trazione fino a rottura è stato possibile determinare il modulo di Young dei diversi condotti (figura 4.12).

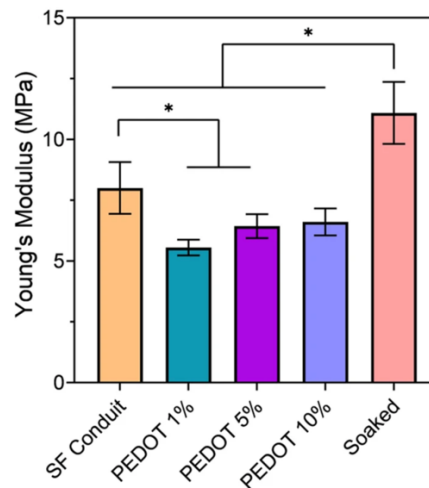


Figura 4.12: modulo di Young dei diversi condotti. [116]

Nella figura precedente si noti l'aumento del modulo di Young nel caso di condotto "soaked". Ciò si deve al fatto che man mano che PEDOT NP nei condotti più in profondità, agiscono come un riempitivo composito, rafforzando le proprietà meccaniche dei condotti.

Nella progettazione dei condotti nervosi è importante tenere conto della loro flessibilità in quanto potrebbero essere collocati in parti del corpo soggette ad ampi movimenti. In generale, i condotti si devono flettere senza occlusione del lume interno: piegando i condotti di 50° si è notato che sia il condotto "soaked" che quelli concentrazioni di 1 % e 5 % non hanno mostrato occlusione, mentre il condotto caricati al 10 % di PEDOT NP ha raggiunto il collasso prima dei 50°. Anche nel caso si sutura non si è assistito all'occlusione del lume.

La presenza di PEDOT NP contribuisce al miglioramento delle proprietà conduttive dei condotti. Il grafico sottostante (figura 4.13) mostra i risultati della conduttività elettrica nei vari campioni presi in considerazione. In generale, l'aggiunta di NP aumenta la conduttività dei campioni. Il condotto SF imbevuto degli NP PEDOT mostra una conduttività inferiore rispetto agli altri campioni probabilmente a causa dell'elevata dispersione degli NP assorbiti dal sistema, che a sua volta riduce le interazioni nel sistema.

Infine, i condotti hanno dimostrato di promuovere la proliferazione delle cellule di Schwann e l'adeguata porosità hanno impedito l'infiltrazione di fibroblasti al loro interno evitando, dunque, la formazione di tessuto cicatriziale al loro interno.

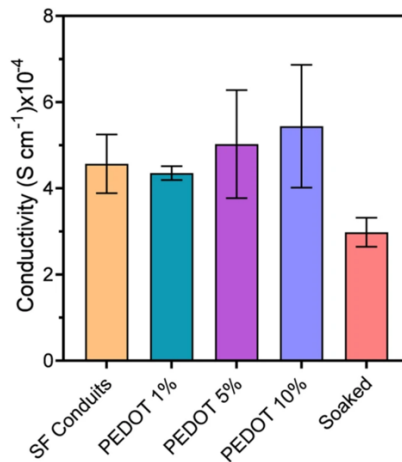


Figura 4.13: conducibilità dei diversi condotti. [116]

[116]

#### 4.2.3.4 *Prospettive future*

Nonostante esistano già numerosi studi riguardo ai tre polimeri conduttivi citati in precedenza, rimane il notevole problema della loro scarsa degradabilità. Per questo motivo, c'è uno sforzo continuo nella ricerca di polimeri conduttivi maggiormente compatibili e biodegradabili.

Il polipirrolo può essere modificato per creare poli(3,4-alkylenedioxyppyrole) (PXDOP) che presenta una maggiore stabilità elettrochimica.

Combinando l'acido poli lattico (PLA) con anilina è possibile ottenere PAP. Questo materiale si è mostrato biodegradabile e biocompatibile e mostra una conduttività simile a quella della polianilina. Tuttavia, non ha riscosso successo nell'applicazione a causa delle sue scarse proprietà meccaniche. Per superare questa problematica è stato sviluppato, tramite una combinazione alternativa di PLA e anilina, il PLLAP che possiede proprietà meccaniche migliorate.

PAP può essere combinato con l'estere etilico di glicina a produrre il polifosfozene: è solubile in solventi organici comuni, si degrada in acqua in prodotti innocui e sostiene l'adesione delle cellule di Schwann.

[100]



## 5. CONCLUSIONE

Questo elaborato ha esaminato approfonditamente le lesioni ai nervi periferici (PNI) e le diverse modalità di trattamento, concentrandosi, inoltre, su sfide ed opportunità. Le PNI rappresentano un grosso problema clinico influenzando significativamente la qualità della vita dei pazienti colpiti.

La complessità del sistema nervoso, responsabile della trasmissione ed elaborazione delle informazioni, comporta approcci innovativi per recuperare le funzioni perse in seguito ad una lesione. Tuttavia, la stretta collaborazione tra medici ed ingegneri ha portato ad importanti progressi nelle modalità di riparazione delle PNI. Da approcci tradizionali microchirurgici, come l'innesto autologo, si è passati a tecniche più innovative, meno invasive e con meno difficoltà legate al loro utilizzo. Le neuroguide per la rigenerazione dei nervi periferici (NGC) si sono dimostrate alternative valide e promettenti alle tecniche tradizionali offrendo supporto meccanico, protezione ed orientamento ai nervi in rigenerazione. Inoltre, la possibilità di funzionalizzare o riempire i lumi di queste strutture mediante molecole bioattive in grado di promuovere la ricrescita del tessuto nervoso ha reso ancora più interessante questo approccio nell'ingegneria tissutale.

Inoltre, l'introduzione di una stimolazione elettrica (ES) a bassa frequenza come parte integrante della terapia e l'utilizzo di NGC conduttive si sono mostrati promettenti. Molti studi, infatti, hanno dimostrato l'efficacia dell'ES nella promozione della ricrescita nervosa, ma il meccanismo sottostante rimane ancora sotto indagine. I continui studi in questo campo, assieme alle recenti innovazioni nell'ambito dei materiali, ha portato allo sviluppo di stimolatori wireless completamente impiantabili e biodegradabili permettendo una stimolazione elettrica anche nel periodo post-operatorio ed eliminando la necessità di un secondo intervento chirurgico per la rimozione del dispositivo.

In conclusione, l'interazione tra nuovi approcci emergenti e le terapie tradizionali è un buon punto di partenza per un approccio più completo ed efficace rispetto alle tecniche tradizionali, offrendo ai pazienti la possibilità di recuperare maggiormente le funzionalità perse e migliorando la loro qualità di vita sia durante che in seguito ai trattamenti.



## BIBLIOGRAFIA

- [1] <https://www.treccani.it/enciclopedia/sistema-nervoso> (luglio 2023)
- [2] <https://www.gradenigo.it/enciclopedia/anatomia/sistema-nervoso> (luglio 2023)
- [3] <https://www.materdomini.it/enciclopedia/anatomia/sistema-nervoso/> (luglio 2023)
- [4] Anastasi – G. Balboni, Trattato di anatomia umana, Edi-Ermes IV 10/2006;
- [5] <https://www.microbiologiaitalia.it/didattica/il-sistema-nervoso-organizzazione-funzionale-e-strutturale/> (luglio 2023)
- [6] <https://www.gavazzeni.it/enciclopedia/anatomia-corpo-umano/sistema-nervoso-somatico/> (luglio 2023)
- [7] <https://www.gradenigo.it/enciclopedia/anatomia/sistema-nervoso/> (luglio 2023)
- [8] <https://www.msmanuals.com/it-it/casa/disturbi-di-cervello,-midollo-spinale-e-nervi/biologia-del-sistema-nervoso/nervi> (luglio 2023)
- [9] <https://www.unisalento.it/documents/20152/189553/CONDUZIONE+IMPULSO+NERVOSO.pdf/8dd13233-6ec2-1487-85f8-681417f20cbb?version=1.0> (luglio 2023)
- [10] [https://www.treccani.it/enciclopedia/fibra-nervosa\\_%28Dizionario-di-Medicina%29/](https://www.treccani.it/enciclopedia/fibra-nervosa_%28Dizionario-di-Medicina%29/) (luglio 2023)
- [11] <https://www.atlanteistologia.unito.it/page-22330f.html?xml=nervoso.Fibre%20Nervose> (luglio 2023)
- [12] <https://www.my-personaltrainer.it/fisiologia/mielina.html> (luglio 2023)<<<
- [13] <https://www.atlanteistologia.unito.it/page20cc65.html?xml=nervoso.Tipi%20di%20neuroni> (luglio 2023)
- [14] <https://www.stateofmind.it/2017/04/neurone-introduzione-psicologia/> (luglio 2023)
- [15] Silverthorn, Fisiologia umana– Un approccio integrato, Pearson Education Italia VI 9/2013.
- [16] <http://superagatoide.altervista.org/neuroni.html> (luglio 2023)
- [17] Nazzi Elisa, Ingegneria Tissutale Per La Rigenerazione Neuronale, tesi di laurea triennale, Università degli Studi di Padova, 2022, Prof. Andrea Bagno
- [18] Filippo Baliviera, La Rigenerazione Neurale: Analisi Delle Neuroguide Impiegate Nell’Ingegneria Tissutale, tesi di laurea triennale, Università degli Studi di Padova, 2022, Prof. Piero Pavan
- [19] <https://www.my-personaltrainer.it/fisiologia/nervi.html> (luglio 2023)
- [20] <https://www.my-personaltrainer.it/biologia/membrana-plasmatica.html> (luglio 2023)
- [21] <https://www.osteolab.net/potenziale-di-membrana/> (luglio 2023)
- [22] <https://www.tesionline.it/appunti/medicina-e-chirurgia/fondamenti-anatomofisiologici-dell-attivita-psichica/il-potenziale-d-azione/1049/4> (luglio 2023)
- [23] <https://www.biopills.net/potenziale-di-membrana-potenziale-azione/> (luglio 2023)
- [24] <https://www.unisalento.it/documents/20152/189553/POTENZIALE+D%27AZIONE.pdf/defd3a83-7680-b116-48de-c8239a10182c?version=1.0>
- [25] L. Noël, P. Liverneaux, Gestione e rieducazione delle lesioni nervose periferiche, EMC - Medicina Riabilitativa, Volume 21, Issue 2, 2014
- [26] <https://www.my-personaltrainer.it/salute-benessere/neuropatia-periferica.html> (luglio 2023)
- [27] <https://cordis.europa.eu/article/id/156595-mechanisms-of-nerve-regeneration/it> (luglio 2023)

- [28] <https://www.humanitas.it/neuropatia-periferica/> (luglio 2023)
- [29] <https://www.ignaziomarcoccio.it/specializzazioni/chirurgia-plesso-brachiale/classificazione-lesioni-nervose/> (luglio 2023)
- [30] <https://www.ignaziomarcoccio.it/specializzazioni/chirurgia-plesso-brachiale/classificazione-lesioni-nervose/> (luglio 2023)
- [31] Grinsell D, Keating CP. Peripheral nerve reconstruction after injury: a review of clinical and experimental therapies. *Biomed Res Int*. 2014;
- [32] <http://www.tunnelcarpale.org/dnp/lesioni.htm> (luglio 2023)
- [33] Houshyar S, Bhattacharyya A, Shanks R. Peripheral Nerve Conduit: Materials and Structures. *ACS Chem Neurosci*. 2019 Aug 21;10(8):3349-3365. doi: 10.1021/acchemneuro.9b00203. Epub 2019 Jul 5. PMID: 31273975.
- [34] G.A. Brunelli, G.R. Brunelli, La fisiopatologia della riparazione e rigenerazione nervosa, *G.I.O.T.* 2001; 27:155-62
- [35] <https://www.starbene.it/medicina-a-z/degenerazione-del-sistema--nervoso> (luglio 2023)
- [36] <https://www.studocu.com/it/document/politecnico-di-milano/tecnologie-per-la-medicina-rigenerativa/il-sistema-nervoso/10676532> (luglio 2023)
- [37] <https://www.my-personaltrainer.it/alimentazione/unita-motorie.html> (luglio 2023)
- [38] <https://www.youtube.com/watch?v=Jp7VuciOblA> (luglio 2023)
- [39] [http://sba-work.uniurb.it/Archivio/scimotor/didattica/AA\\_2011-2012/MedFisRiab/Neuroplasticit%E0.pdf](http://sba-work.uniurb.it/Archivio/scimotor/didattica/AA_2011-2012/MedFisRiab/Neuroplasticit%E0.pdf) (luglio 2023)
- [40] Vijayavenkataraman S. Nerve guide conduits for peripheral nerve injury repair: A review on design, materials and fabrication methods. *Acta Biomater*. 2020 Apr 1;106:54-69. doi: 10.1016/j.actbio.2020.02.003. Epub 2020 Feb 8. PMID: 32044456.
- [41] Maeng WY, Tseng WL, Li S, Koo J, Hsueh YY. Electroceuticals for peripheral nerve regeneration. *Biofabrication*. 2022 Sep 8;14(4):10.1088/1758-5090/ac8baa. doi: 10.1088/1758-5090/ac8baa. PMID: 35995036; PMCID: PMC10109522.
- [42] Hussain G, Wang J, Rasul A, Anwar H, Qasim M, Zafar S, Aziz N, Razzaq A, Hussain R, de Aguilar JG, Sun T. Current Status of Therapeutic Approaches against Peripheral Nerve Injuries: A Detailed Story from Injury to Recovery. *Int J Biol Sci*. 2020 Jan 1;16(1):116-134. doi: 10.7150/ijbs.35653. PMID: 31892850; PMCID: PMC6930373.
- [43] Liu Wang, Kuntao Chen, Yubo Fan, Lan Yin, Novel implantable devices delivering electrical cues for tissue regeneration and functional restoration, *Medicine in Novel Technology and Devices*, Volume 16, 2022, 100146, ISSN 2590-0935
- [44] Ghasemi, L., Prabhakaran, M.P., Morshed, M., Nasr-Esfahani, M.H., Baharvand, H., Kiani, S., Al-Deyab, S.S. and Ramakrishna, S. (2011), Application of conductive polymers, scaffolds and electrical stimulation for nerve tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med*, 5: e17-e35.
- [45] Caterina d'Aloja, analisi del comportamento meccanico di alcol polivinilico per la rigenerazione nervosa, tesi laure magistrale, università degli studi di Padova, 2022, prof. Silvia Todros, prof. Piero Pavan
- [46] Yoo, M.C.; Kim, J.H.; Kim, Y.J.; Jung, J.; Kim, S.S.; Kim, S.H.; Yeo, S.G. Effects of Electrical Stimulation on Facial Paralysis Recovery after Facial Nerve Injury: A Review on Preclinical and Clinical Studies. *J. Clin. Med*. 2023, 12, 4133. <https://doi.org/10.3390/jcm1212413>

- [47] Lu M-C, Ho C-Y, Hsu S-F, et al. Effects of Electrical Stimulation at Different Frequencies on Regeneration of Transected Peripheral Nerve. *Neurorehabilitation and Neural Repair*. 2008;22(4):367-373. doi:10.1177/1545968307313507
- [48] Liao CF, Hsu ST, Chen CC, Yao CH, Lin JH, Chen YH, Chen YS. Effetti della stimolazione elettrica sulla rigenerazione del nervo periferico in un condotto di gomma siliconica nei ratti trattati con taxolo. *Materiali (Basel)*. Feb 27;13(5):1063. doi: 10.3390/ma13051063. PMID: 32120862; PMCID: PMC7084817.
- [49] Kubiak CA, Kung TA, Brown DL, Cederna PS, Kemp SWP. State-of-the-Art Techniques in Treating Peripheral Nerve Injury. *Plast Reconstr Surg*. 2018 Mar;141(3):702-710. doi: 10.1097/PRS.0000000000004121. PMID: 29140901.
- [50] Chan, K.M., Curran, M.W.T. and Gordon, T. (2016), The use of brief post-surgical low frequency electrical stimulation to enhance nerve regeneration in clinical practice. *J Physiol*, 594: 3553-3559. <https://doi.org/10.1113/JP270892>
- [51] Boyd JG, Gordon T. Neurotrophic factors and their receptors in axonal regeneration and functional recovery after peripheral nerve injury. *Mol Neurobiol*. 2003 Jun;27(3):277-324. doi: 10.1385/MN:27:3:277. PMID: 12845152.]
- [52] Gordon T. Electrical Stimulation to Enhance Axon Regeneration After Peripheral Nerve Injuries in Animal Models and Humans. *Neurotherapeutics*. 2016 Apr;13(2):295-310. doi: 10.1007/s13311-015-0415-1. PMID: 26754579; PMCID: PMC4824030.
- [53] Saad Javeed, Amir H. Faraji, Christopher Dy, Wilson Z. Ray, Matthew R. MacEwan, Application of electrical stimulation for peripheral nerve regeneration: Stimulation parameters and future horizons, *Interdisciplinary Neurosurgery*, Volume 24, 2021,101117, ISSN 2214-7519,
- [54] Liu Z, Wan X, Wang ZL, Li L. Electroactive Biomaterials and Systems for Cell Fate Determination and Tissue Regeneration: Design and Applications. *Adv Mater*. 2021 Aug;33(32):e2007429. doi: 10.1002/adma.202007429. Epub 2021 Jun 12. PMID: 34117803.
- [55] Dongjie Jiang, Bojing Shi, Han Ouyang, Yubo Fan, Zhong Lin Wang, and Zhou Li, Emerging Implantable Energy Harvesters and Self-Powered Implantable Medical Electronics, *ACS Nano* 2020 14 (6), 6436-6448, DOI: 10.1021/acsnano.9b08268
- [56] Dagdeviren C, Li Z, Wang ZL. Energy Harvesting from the Animal/Human Body for Self-Powered Electronics. *Annu Rev Biomed Eng*. 2017 Jun 21;19:85-108. doi: 10.1146/annurev-bioeng-071516-044517. PMID: 28633564.
- [57] Koo, J., MacEwan, M.R., Kang, SK. et al. Wireless bioresorbable electronic system enables sustained nonpharmacological neuroregenerative therapy. *Nat Med* 24, 1830–1836 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0196-2> (agosto 2023)
- [58] Maria Letizia Guida, Impiego del modello animale ovino per la messa a punto di innovativi protocolli terapeutici per il trattamento delle lesioni del nervo periferico, tesi di dottorato, Università degli Studi di Sassari, 2015-2016, Prof. Maria Lucia Manunta, Prof. Salvatore Naitana
- [59] Veena K. Singh, Ansarul Haq, Meenakshi Tiwari, Ajit K. Saxena, Approach to management of nerve gaps in peripheral nerve injuries, *Injury*, Volume 53, Issue 4, 2022, Pages 1308-1318, ISSN 0020-1383,
- [60] Ramachandran S, Midha R. Recent advances in nerve repair. *Neurol India* 2019;67, Suppl S1:106-14

- [61] [https://www.treccani.it/enciclopedia/chirurgia-ortopedica\\_%28Enciclopedia-della-Scienza-e-della-Tecnica%29/](https://www.treccani.it/enciclopedia/chirurgia-ortopedica_%28Enciclopedia-della-Scienza-e-della-Tecnica%29/) (agosto 2023)
- [62] <https://www.paralysiscenter.org/nerve-graft> (agosto 2023)
- [63] Enrico De Rose, *Peripheral Nerve Injury and Bioactive Polymers Development for Nerve Regeneration*, tesi di dottorato, università degli studi di Padova, Prof. Riccardo Manganelli, Prof. Maria Teresa Conconi, Prof. Andrea Porzionato
- [64] <https://www.tetrahand.com.au> (agosto 2023)
- [65] Wilson Z. Ray, Susan E. Mackinnon, *Management of nerve gaps: Autografts, allografts, nerve transfers, and end-to-side neuroorrhaphy*, *Experimental Neurology*, Volume 223, Issue 1, 2010, Pages 77-85, ISSN 0014-4886,
- [66] <https://www.sigmaaldrich.com/IT/it/applications/materials-science-and-engineering/tissue-engineering> (agosto 2023)
- [67] Esposito Matteo Cosimo, *Sintesi e Caratterizzazione di una Nuova Classe di Dispositivi Medici Impiantabili a Base di Collagene per Applicazioni in Tissue Engineering*, Università degli studi del Salento, Ing. Alessandro Sannino
- [68] Ikada, Yoshito. "Challenges in tissue engineering." *Journal of the Royal Society Interface* 3.10 (2006): 589-601.
- [69] Timothy J. Keane, Stephen F. Badylak, *Biomaterials for tissue engineering applications*, *Seminars in Pediatric Surgery*, Volume 23, Issue 3, 2014, Pages 112-118, ISSN 1055-8586,
- [70] <https://www.repository.unipr.it/bitstream/1889/1437/3/4.%20Introduzione.pdf> (agosto 2023)
- [71] Porzionato A, Barbon S, Stocco E, Dalzoppo D, Contran M, De Rose E, Parnigotto PP, Macchi V, Grandi C, De Caro R. Sviluppo di condotti nervosi a base di alcol polivinilico ossidato accoppiati al fattore neurotrofico ciciliare. *Materiali (Basel)*. 2019 giu 21;12(12):1996. doi: 10.3390/ma12121996. PMID: 31234386; PMCID: PMC6631399.
- [72] Konofaos P, Ver Halen JP. Nerve repair by means of tubulization: past, present, future. *J Reconstr Microsurg*. 2013 Mar;29(3):149-64. doi: 10.1055/s-0032-1333316. Epub 2013 Jan 9. PMID: 23303520.
- [73] Verreck G, Chun I, Li Y, Kataria R, Zhang Q, Rosenblatt J, Decorte A, Heymans K, Adriaensen J, Bruining M, Van Remoortere M, Borghys H, Meert T, Peeters J, Brewster ME. Preparazione e caratterizzazione fisico-chimica di guide nervose biodegradabili contenenti l'agente di crescita nervosa sabeluzolo. *Biomateriali*. 2005 Apr;26(11):1307-15. doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.04.040. PMID: 15475061.
- [74] Arslantunali D, Dursun T, Yucel D, Hasirci N, Hasirci V. Peripheral nerve conduits: technology update. *Med Devices (Auckl)*. 2014 Dec 1;7:405-24. doi: 10.2147/MDER.S59124. PMID: 25489251; PMCID: PMC4257109.
- [75] Pierre Sarazin, Xavier Roy, Basil D. Favis, *Controlled preparation, and properties of porous poly(l-lactide) obtained from a co-continuous blend of two biodegradable polymers*, *Biomaterials*, Volume 25, Issue 28, 2004, Pages 5965-5978, ISSN 0142-9612
- [76] Valeria Chiono, Chiara Tonda-Turo, *Trends in the design of nerve guidance channels in peripheral nerve tissue engineering*, *Progress in Neurobiology*, Volume 131, 2015, Pages 87-104, ISSN 0301-0082,
- [77] Sarker, M., Naghieh, S., McInnes, A.D., Schreyer, D.J. e Chen, X. (2018), *Progettazione strategica e fabbricazione di condotti di guida nervosa per la rigenerazione dei nervi periferici*. *Biotechnol. J.*, 13: 1700635. <https://doi.org/10.1002/biot.201700635>

- [78] Xu Jiang, Shawn H. Lim, Hai-Quan Mao, Sing Yian Chew, Current applications and future perspectives of artificial nerve conduits, *Experimental Neurology*, Volume 223, Issue 1, 2010, Pages 86-101, ISSN 0014-4886
- [79] Evans, G.R.D. (2001), Peripheral nerve injury: A review and approach to tissue engineered constructs. *Anat. Rec.*, 263: 396-404. <https://doi.org/10.1002/ar.1120>
- [80] Laura M Marquardt, Shelly E Sakiyama-Elbert, Engineering peripheral nerve repair, *Current Opinion in Biotechnology*, Volume 24, Issue 5, 2013, Pages 887-892, ISSN 0958-1669, <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.05.006>.
- [81] Fornasari BE, Carta G, Gambarotta G, Raimondo S. Natural-Based Biomaterials for Peripheral Nerve Injury Repair. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020 Oct 16;8:554257. doi: 10.3389/fbioe.2020.554257. PMID: 33178670; PMCID: PMC7596179.
- [82] <https://erbagliantichirimedi.altervista.org/acido-ialuronico-struttura-chimica-proprieta-e-impieghi/> (agosto 2023)
- [83] Yu X, Zhang T, Li Y. 3D Printing and Bioprinting Nerve Conduits for Neural Tissue Engineering. *Polymers (Basel)*. 2020 Jul 23;12(8):1637. doi: 10.3390/polym12081637. PMID: 32717878; PMCID: PMC7465920.
- [84] Yu X, Zhang T, Li Y. 3D Printing and Bioprinting Nerve Conduits for Neural Tissue Engineering. *Polymers (Basel)*. 2020 Jul 23;12(8):1637. doi: 10.3390/polym12081637. PMID: 32717878; PMCID: PMC7465920.
- [85] Yan Y, Yao R, Zhao J, Chen K, Duan L, Wang T, Zhang S, Guan J, Zheng Z, Wang X, Liu Z, Li Y, Li G. Implantable nerve guidance conduits: Material combinations, multi-functional strategies and advanced engineering innovations. *Bioact Mater.* 2021 Oct 5;11:57-76. doi: 10.1016/j.bioactmat.2021.09.030. PMID: 34938913; PMCID: PMC8665266.
- [86] Poongodi R, Chen YL, Yang TH, Huang YH, Yang KD, Lin HC, Cheng JK. Bio-Scaffolds as Cell or Exosome Carriers for Nerve Injury Repair. *Int J Mol Sci.* 2021 Dec 12;22(24):13347. doi: 10.3390/ijms222413347. PMID: 34948144; PMCID: PMC8707664.
- [87] Pinho, A.C., Fonseca, A.C., Serra, A.C., Santos, J.D. and Coelho, J.F.J. (2016), Peripheral Nerve Regeneration: Current Status and New Strategies Using Polymeric Materials. *Adv. Healthcare Mater.*, 5: 2732-2744. <https://doi.org/10.1002/adhm.201600236>
- [88] <https://www.salomon.com/it-it/what-gore-tex> (agosto 2023)
- [89] Schlosshauer, Burkhard Ph.D.; Dreesmann, Lars; Schaller, Hans-Eberhard M.D.; Sinis, Nektarios M.D.. Synthetic Nerve Guide Implants in Humans: A Comprehensive Survey. *Neurosurgery* 59(4):p 740-748, October 2006. | DOI: 10.1227/01.NEU.0000235197.36789.42
- [90] S. Kehoe, X.F. Zhang, D. Boyd, FDA approved guidance conduits and wraps for peripheral nerve injury: A review of materials and efficacy, *Injury*, Volume 43, Issue 5, 2012, Pages 553-572, ISSN 0020-1383, <https://doi.org/10.1016/j.injury.2010.12.030>.
- [91] <https://www.xpolymers.it/pcl.html> (agosto 2023)
- [92] Holly Gregory, James B. Phillips, Materials for peripheral nerve repair constructs: Natural, proteins or synthetic polymers?, *Neurochemistry International*, Volume 143, 2021, 104953, ISSN 0197-0186, <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2020.104953>.
- [93] Matsumine, H., Sasaki, R., Yamato, M., Okano, T. and Sakurai, H. (2014), A polylactic acid non-woven nerve conduit for facial nerve regeneration in rats. *J Tissue Eng Regen Med*, 8: 454-462. <https://doi.org/10.1002/term.1540>
- [94] Patrick Duffy, Seán McMahon, Xi Wang, Shane Keaveney, Eoin D. O'Cearbhaill, Iban Quintana, Francisco J. Rodríguez, Wenxin Wang, Synthetic

bioresorbable poly- $\alpha$ -hydroxyesters as peripheral nerve guidance conduits; a review of material properties, design strategies and their efficacy to date, DOI <https://doi.org/10.1039/C9BM00246D>

[95] Moskow J, Ferrigno B, Mistry N, Jaiswal D, Bulsara K, Rudraiah S, Kumbar SG. Review: Bioengineering approach for the repair and regeneration of peripheral nerve. *Bioact Mater.* 2018 Oct 10;4(1):107-113. doi: 10.1016/j.bioactmat.2018.09.001. Erratum in: *Bioact Mater.* 2020 Dec 04;6(6):1789-1790. PMID: 30723843; PMCID: PMC6351356.

[96] Hasiba-Pappas S, Kamolz LP, Luze H, Nischwitz SP, Holzer-Geissler JCJ, Tuca AC, Rienmüller T, Polz M, Ziesel D, Winter R. Does Electrical Stimulation through Nerve Conduits Improve Peripheral Nerve Regeneration?-A Systematic Review. *J Pers Med.* 2023 Feb 26;13(3):414. doi: 10.3390/jpm13030414. PMID: 36983596; PMCID: PMC10057314.

[97] Liu, Z., Wan, X., Wang, Z. L., Li, L., *Electroactive Biomaterials and Systems for Cell Fate Determination and Tissue Regeneration: Design and Applications.* *Adv. Mater.* 2021, 33, 2007429. <https://doi.org/10.1002/adma.202007429>

[98] Shuping Wang, Shui Guan, Wenfang Li, Dan Ge, Jianqiang Xu, Changkai Sun, Tianqing Liu, Xuehu Ma, 3D culture of neural stem cells within conductive PEDOT layer-assembled chitosan/gelatin scaffolds for neural tissue engineering, *Materials Science and Engineering: C*, Volume 93, 2018, Pages 890-901, ISSN 0928-4931, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.08.054>.

[99] [https://www.soc.chim.it/sites/default/files/users/sci\\_didattica/Polimeri-conduttori.pdf](https://www.soc.chim.it/sites/default/files/users/sci_didattica/Polimeri-conduttori.pdf) (agosto 2023)

[100] Richard Balint, Nigel J. Cassidy, Sarah H. Cartmell, *Conductive polymers: Towards a smart biomaterial for tissue engineering*, *Acta Biomaterialia*, Volume 10, Issue 6, 2014, Pages 2341-2353, ISSN 1742-7061, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.02.015>.

[101] Nathalie K. Guimard, Natalia Gomez, Christine E. Schmidt, *Conducting polymers in biomedical engineering*, *Progress in Polymer Science*, Volume 32, Issues 8–9, 2007, Pages 876-921, ISSN 0079-6700, <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2007.05.012>.

[102] <https://www.chimica-online.it/materiali/polimeri-conduttivi.htm#:~:text=Dopaggio,AlCl3%20o%20FeCl3>. (agosto 2023)

[103] R. Ravichandran, S. Sundarrajan, J.R. Venugopal, S. Mukherjee, S. Ramakrishna *Applications of conducting polymers and their issues in biomedical engineering* *J R Soc Interface*, 7 (2010), pp. S559-S57, <https://doi.org/10.1098/rsif.2010.0120.focus>

[104] Marsudi MA, Ariski RT, Wibowo A, Cooper G, Barlian A, Rachmantyo R, Bartolo PJDS. *Conductive Polymeric-Based Electroactive Scaffolds for Tissue Engineering Applications: Current Progress and Challenges from Biomaterials and Manufacturing Perspectives.* *Int J Mol Sci.* 2021 Oct 26;22(21):11543. doi: 10.3390/ijms222111543. PMID: 34768972; PMCID: PMC8584045.

[105] Anderson M, Shelke NB, Manoukian OS, Yu X, McCullough LD, Kumbar SG. *Peripheral Nerve Regeneration Strategies: Electrically Stimulating Polymer Based Nerve Growth Conduits.* *Crit Rev Biomed Eng.* 2015;43(2-3):131-59. doi: 10.1615/CritRevBiomedEng.2015014015. PMID: 27278739; PMCID: PMC5266796.2

[106] Saberi, A.; Jabbari, F.; Zarrintaj, P.; Saeb, M.R.; Mozafari, M. *Electrically Conductive Materials: Opportunities and Challenges in Tissue Engineering.* *Biomolecules* 2019, 9, 448. <https://doi.org/10.3390/biom9090448>



- [107] Payam Zarrintaj, Ehsan Zangene, Saeed Manouchehri, Leila Mohammadi Amirabad, Nafiseh Baheiraei, Mahmoud Reza Hadjighasem, Mehdi Farokhi, Mohammad Reza Ganjali, Brian W. Walker, Mohammad Reza Saeb, Masoud Mozafari, Sabu Thomas, Nasim Annabi, Conductive biomaterials as nerve conduits: Recent advances and future challenges, *Applied Materials Today*, Volume 20, 2020, 100784, ISSN 2352-9407, <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2020.100784>.
- [108] Wang, X., Gu, X., Yuan, C., Chen, S., Zhang, P., Zhang, T., Yao, J., Chen, F. and Chen, G. (2004), Evaluation of biocompatibility of polypyrrole in vitro and in vivo. *J. Biomed. Mater. Res.*, 68A: 411-422. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.20065>
- [109] Haixing Xu, Jeremy M. Holzwarth, Yuhua Yan, Peihu Xu, Hua Zheng, Yixia Yin, Shipu Li, Peter X. Ma, Conductive PPY/PDLLA conduit for peripheral nerve regeneration, *Biomaterials*, Volume 35, Issue 1, 2014, Pages 225-235, ISSN 0142-9612, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.10.002>.
- [110] Gagan Kaur, Raju Adhikari, Peter Cass, Mark Bown, Pathiraja Gunatillake , Electrically conductive polymers and composites for biomedical applications, 2015, DOI <https://doi.org/10.1039/C5RA01851J>
- [111] Wang, G, Wu, W, Yang, H, Zhang, P, Wang, J-Y. 2020. Intact polyaniline coating as a conductive guidance is beneficial to repairing sciatic nerve injury. *J Biomed Mater Res Part B*. 2020: 108B: 128–142.
- [112] Kayser LV, Lipomi DJ. Stretchable Conductive Polymers and Composites Based on PEDOT and PEDOT:PSS. *Adv Mater*. 2019 Mar;31(10):e1806133. doi: 10.1002/adma.201806133. Epub 2019 Jan 2. PMID: 30600559; PMCID: PMC6401235.
- [113] Y.Wang. Research progress on a novel conductive polymer – poly(3,4 ethylenedioxythiophene)(pedot). *J. Phys.: Conf. Series*, 152(1), DOI 10.1088/1742-6596/152/1/012023
- [114] Leonardo Benini, Caratterizzazione di film sottili di PEDOT:PSS, tesi laurea triennale, Università di Bologna, 2014, prof. Beatrice Fraboni, prof. Marco Marzocchi
- [115] Xia Y, Yan G, Lin J. Review on Tailoring PEDOT:PSS Layer for Improved Device Stability of Perovskite Solar Cells. *Nanomaterials (Basel)*. 2021 Nov 19;11(11):3119. doi: 10.3390/nano11113119. PMID: 34835883; PMCID: PMC8619312.]
- [116] Escobar, A., Serafin, A., Carvalho, M.R. et al. Electroconductive poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT) nanoparticle-loaded silk fibroin biocomposite conduits for peripheral nerve regeneration. *Adv Compos Hybrid Mater* 6, 118 (2023). <https://doi.org/10.1007/s42114-023-00689->
- [117] [https://www.univpm.it/Entra/Engine/RAServeFile.php/f/P003415/allegati\\_doc/cenni\\_SI\\_STEMA\\_NERVOSO.pdf](https://www.univpm.it/Entra/Engine/RAServeFile.php/f/P003415/allegati_doc/cenni_SI_STEMA_NERVOSO.pdf)
- [118] Ohan S. Manoukian, Jiana T. Baker, Swetha Rudraiah, Michael R. Arul, Anthony T.Vella, Abraham J. Domb, Sangamesh G. Kumbar, Functional polymeric nerve guidance conduits and drug delivery strategies for peripheral nerve repair and regeneration, *Journal of Controlled Release*, Volume 317, 2020, Pages 78-95, ISSN 0168-3659, <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.11.021>.