

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA  
FACOLTÀ DI INGEGNERIA

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

TESI DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

# **BIOMATERIALI NELLA RIGENERAZIONE NEURALE**

RELATORE: PROF. ANDREA BAGNO

LAUREANDO: RIGONI ANDREA



ANNO ACCADEMICO: 2011-2012



# Indice

<b>Abstract</b>	<b>5</b>
<b>1.Introduzione</b>	<b>6</b>
1.1. Danni al sistema nervoso centrale.....	6
1.1.1. Cause dei danni al SNC.....	6
1.1.2. Le fasi del SCI.....	7
1.1.3. Problemi derivanti dal SCI.....	8
1.2. Limiti alla rigenerazione.....	8
1.2.1. Morte cellulare.....	9
1.2.2. Cicatrice gliale.....	9
1.2.3. Fattori inibitori.....	11
1.3 Tecniche terapeutiche.....	12
<b>2. Tipi di biomateriale usati come scaffold</b>	<b>13</b>
2.1.Confronto fra biomateriali e proprietà richieste.....	13
2.1.1. Proprietà generali.....	13
2.1.2.Tempo di degradazione.....	14
2.1.3.Idrogel naturali e sintetici.....	14
2.1.4. Collagene.....	15
2.1.5 Polipirrolo.....	16
2.2.Proprietà strutturali.....	16
2.2.1. Modulo di compressione.....	17
2.2.2. Grandezza della maglia.....	18
2.2.3. Porosità.....	19
2.2.4. Linearità.....	20
<b>3. Tecniche di fabbricazione degli scaffold</b>	<b>22</b>
3.1. Freeze-dry.....	22
3.2. Gas foaming.....	24
3.3. Injecton molding, solvent evaporation.....	26

3.4. Liquid-liquid phase separation.....	26
3.5. Electrospinning.....	27
<b>4. Rilascio di fattori terapeutici</b>	<b>29</b>
4.1. Fattori neurotrofici.....	29
4.2. Proteine dell'ECM.....	31
4.3. Terapia cellulare.....	32
4.3.1. Cellule di Schwann.....	32
4.3.2. Cellule della guaina olfattiva (OECs).....	33
4.3.3. Cellule nervose staminali.....	34
4.4. Terapia genica.....	36
4.4.1. Vettori non-virali.....	36
4.4.2. Vettori virali.....	37
4.5. Agenti anti inibitori.....	38
<b>5. Conclusioni</b>	<b>39</b>
<b>Glossario</b>	<b>41</b>
<b>Bibliografia</b>	<b>44</b>

# Abstract

La rigenerazione e il recupero dei tessuti nervosi sono una grande sfida per la medicina, perché influiscono pesantemente sulla qualità della vita dei pazienti. I danni al sistema nervoso centrale provocano effetti irreversibili e le strategie di cura attuali non offrono risultati sicuri. Lo sviluppo dell'ingegneria tissutale offre un nuovo approccio al problema, con la creazione di scaffold artificiali multifunzionali che agiscono su vari livelli nel tessuto lesionato, fornendo supporto fisico e biochimico alla crescita delle cellule nervose. In questo lavoro sono presentate le attuali tecniche di progettazione degli scaffold e le strategie per favorire la rigenerazione.

# Capitolo 1

## Introduzione

### 1.1. Danni al sistema nervoso centrale

Il sistema nervoso centrale è l'insieme dell'encefalo, protetto dalla scatola cranica, e del midollo spinale, sostenuto dalla colonna vertebrale. Il suo compito è di ricevere le informazioni esterne provenienti dal sistema nervoso periferico, elaborarle e inviare le risposte.

#### 1.1.1. Cause dei danni al SNC

Le principali cause di danni al SNC sono tre: la prima sono traumi fisici, ad esempio incidenti d'auto, che possono provocare danni acuti all'encefalo o al midollo centrale; il secondo evento che può provocare danni ai neuroni è una carenza locale d'ossigeno detta ipossia, di solito causata, come nel caso dell'ictus, dall'ischemia, cioè un ridotto afflusso di sangue alle cellule; la terza causa sono le malattie neurodegenerative, come l'Alzheimer, il Parkinson o la sclerosi.

La prima e la seconda causa provocano una rapida degenerazione dei neuroni, seguita spesso dalla morte degli stessi; tuttavia se alcune cellule nervose vengono danneggiate solo parzialmente è possibile che si attivino dei complessi processi cellulari che consentono il loro ripristino e sopravvivenza e quindi il verificarsi di qualche fenomeno di rigenerazione.

I traumi fisici sono la causa più frequente di danni al midollo osseo (*spinal cord injury* SCI): negli Stati Uniti il numero di lesionati è di circa 32 su milione di persone, con una media di 11000 nuovi lesionati ogni anno. La fascia più colpita sono i giovani: l'età media delle persone affette da SCI è di 26 anni, con una netta prevalenza maschile, infatti circa la metà delle cause di lesioni sono dovute a incidenti stradali; fra le altre cause frequenti ci sono gli incidenti sportivi, le cadute, e gli atti di violenza. Nella maggior parte di questi casi gli SCI sono dovuti a una deformazione delle ossa della colonna vertebrale che provocano contusioni al midollo; i danni sono dovuti sia al trauma iniziale che alle conseguenze patologiche: le cellule attorno alla lesione sono infatti soggette ad un continuo processo di distruzione e riparazione.

### 1.1.2. Le fasi del SCI

Durante i circa 9 mesi di decorso del SCI in un paziente si sviluppano tre fasi: acuta, secondaria e cronica.

La fase acuta è provocata dall'urto meccanico, causa danni al midollo osseo e al tessuto adiacente con la morte di grandi quantità di cellule. Si sviluppa di conseguenza una serie di processi paralleli causati dal danno iniziale, che tendono a peggiorare la gravità del danno: i livelli dei principali elettroliti ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) vengono alterati (eccitotossicità), si ha accumulo di liquidi (edema), emorragie focali, vasospasmi e trombosi della microvascolatura spinale. Si ha inoltre una concentrazione extracellulare di amminoacidi come il glutammato e radicali liberi in concentrazioni citotossiche.

Nelle 24ore seguenti la lesione si ha la fase secondaria, in cui il parenchima del midollo spinale è invaso da granulociti neutrofili, monociti e linfociti, responsabili della risposta infiammatoria locale.

Con la fase cronica, per via dei processi secondari, la lesione si è espansa ben oltre il sito iniziale, sia in senso anterogrado che retrogrado: la materia bianca mostra una demielinizzazione parziale o totale, che causa scompensi nella conduzione; circa un paziente su 4 sviluppa una cisti che si espande progressivamente causando una siringomielia; si manifestano danni

istopatologici quali dissoluzione della materia grigia, deposito di tessuto connettivo e gliosi; i deficit neurali complessivi sono lo sviluppo di ipersensibilità e dolore cronico.

### 1.1.3. Problemi derivanti dal SCI

La perdita di sensibilità e di mobilità causata dallo SCI genera gravi problemi nella salute dei pazienti, fra cui ricorrenti calcoli renali, infezioni al tratto urinario, lesioni da decubito e problemi cardiaci e respiratori.

La maggior parte dei decessi causati dagli SCI è dovuta a complicazioni respiratorie: danni ad ogni livello del midollo spinale provocano problemi respiratori a causa della distruzione dei nuclei responsabili del movimento e dei tratti del controllo motorio discendente che innervano i muscoli del diaframma, intercostali, del torace e addominali, con il risultato che la maggior parte dei decessi causati dagli SCI sono dovute a complicazioni respiratorie. Ugualmente danneggiati sono anche i segnali sensoriali ascendenti per il controllo muscolare dei riflessi della tosse e del vomito, il rilascio di secrezioni e i chemiorecettori periferici del sistema respiratorio.

Le lesioni al midollo osseo hanno un notevole costo anche sulla società: in termini economici il costo diretto negli Stati Uniti per tutti i casi di SCI è stato calcolato essere di 7.736 miliardi di dollari (in valuta del 1995); questo rappresenta solo il 35% dell'effettivo costo sociale poiché vanno sommati la perdita di salari, i fringe benefits e la riduzione della produttività che rappresentano una perdita economica molto più gravosa.

## 1.2. Limiti alla rigenerazione

Vari motivi determinano l'estrema limitatezza della rigenerazione spontanea nel SNC dei mammiferi adulti: fattori intrinseci come la ridotta capacità di riproduzione delle cellule nervose, dovuta al fatto che non esprimono una serie di fattori necessari per entrare nello stato di crescita attiva; fattori estrinseci, cioè l'ambiente sfavorevole che si genera dopo una lesione dovuto alla vasta gamma



di molecole inibitrici che vengono secrete sia nell'ECM che nella mielina ed inoltre ad una serie di fenomeni secondari che si sviluppano come conseguenza al trauma.

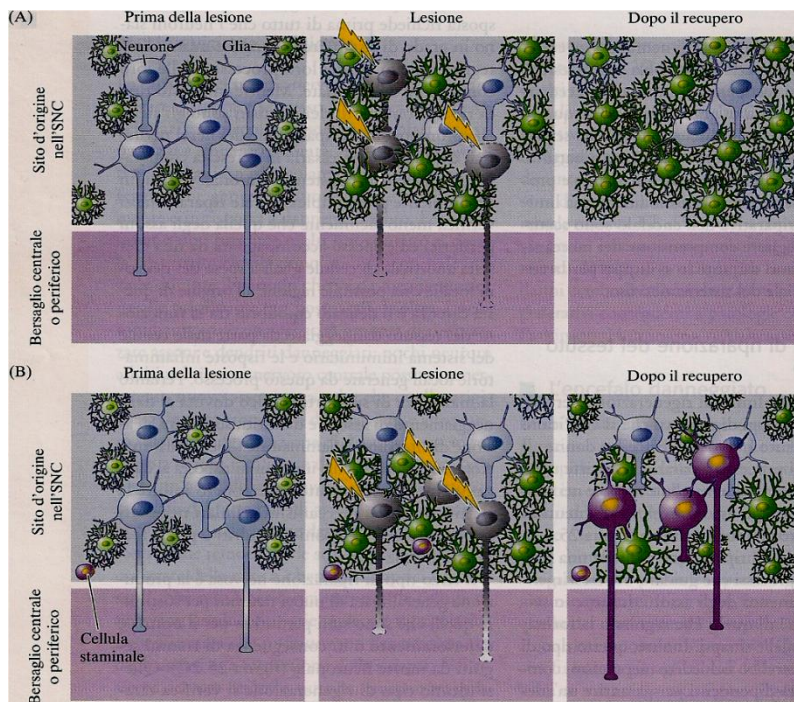
### 1.2.1 Morte cellulare

Una diretta conseguenza di un trauma cerebrale è la morte cellulare, sia necrotica, cioè derivante da fattori esterni quali appunto il trauma subito, sia apoptotica, ovvero morte cellulare programmata definita e guidata da fattori biochimici. In seguito a lesioni alle cellule nervose vengono liberate grandi quantità di neurotrasmettitori, che generano scompensi nel tessuto: i neuroni adiacenti vengono sovra stimolati, con la possibilità di morte degli stessi; viene inoltre modificata l'attività di alcune molecole, come ad esempio membri della famiglia Bcl-2 con funzione antiapoptica. Con la riduzione delle Bcl-2 viene liberato nel citosol il citocromo-c, che catalizza la produzione della caspasi-3, un enzima che se attivato induce nell'apoptosi. L'apoptosi è una delle cause principali di danni a lungo termine nel sistema nervoso.

Il SNC è isolato dal resto dell'organismo dalla barriera emato-encefalica, per cui la sua risposta immunitaria è diversa da quella del SNP. Dopo una lesione ai tessuti dell'encefalo, e quindi anche dopo l'impianto di uno scaffold, una piccola parte dell'infiammazione è dovuta all'infiltrazione di macrofagi e cellule giganti del sistema immunitario esterno dai vasi sanguigni danneggiati: la parte più consistente è comunque dovuta alle microglia e agli astrociti locali. Nei primi giorni dopo la ferita si ha la risposta infiammatoria acuta, dovuta alle sostanze citotossiche emesse dalla microglia, che possono danneggiare collateralmente anche cellule sane. Inoltre, attraverso le lacerazioni sulle barriere emato-encefaliche hanno accesso ai tessuti neurali anche i radicali liberi che generano danni secondari diminuendo sensibilmente il potenziale rigenerativo dei neuroni. È stato tuttavia dimostrato che la risposta immunitaria originata da un impianto è dovuta al trauma meccanico dell'innesto, e non alla presenza di un materiale estraneo nel sistema.

## 1.2.2 Cicatrice gliale

Oltre alla risposta infiammatoria, le cellule gliali sono anche responsabili di un altro fenomeno che limita notevolmente la crescita degli assoni: la cicatrizzazione gliale (Figura 1.1).



**Figura 1.1** Risposta delle cellule nervose del sistema nervoso centrale ad una lesione: (A) Le cellule gliali (in verde) quiescenti prima della lesione cominciano a crescere, diventando ipertrofiche e formando la cicatrice gliale; al contempo gli assoni e i dendriti degenerano, con la conseguente scomparsa delle connessioni. (B) Se sono presenti cellule staminali nervose (in viola) queste proliferano, creando nuovi neuroblasti che si differenziano, integrandosi al tessuto danneggiato e stabilendo nuove connessioni con le cellule sopravvissute.

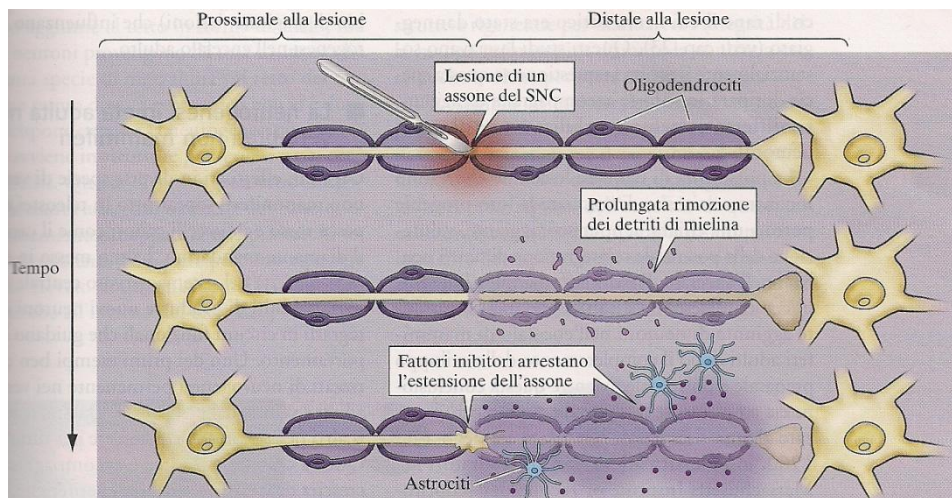
Nel tessuto neurale danneggiato non si riproducono i segnali molecolari finalizzati alla crescita neuronale che si presentano durante lo sviluppo; si ha invece una proliferazione delle cellule gliali quali astroцитi e microglie, meno sensibili all'apoptosi, che, avendo funzione immunitaria, sono all'origine dei processi infiammatori locali, secernono agenti inibitori e impediscono fisicamente la crescita dei neuroni.

Coadiuvate dall'aumento di fattori come il fattore di crescita trasformante (TGF), il fattore di crescita dei fibroblasti (FGF), interleuchine e il fattore di crescita

insulino-simile (IGF-1) e grazie all'attivazione dei precursori gliali, quiescenti in condizioni fisiologiche, le microglie si sviluppano in maniera ipertrofica, dando origine ad una barriera fisica, simile alla cicatrice dei fibroblasti che si sviluppa nei tessuti periferici, detta cicatrice gliale, che ha lo scopo di riparare i danni e di isolare ogni materiale nocivo in contatto con il tessuto.

### 1.2.3. Fattori inibitori

Insieme all'impedimento fisico che rappresenta la cicatrice gliale nello sviluppo degli assoni, il suo ruolo inibitore si svolge anche a livello biochimico: fra le cellule che la compongono, oltre alla microglia, ci sono anche astrociti e gli oligodendrociti che sono in grado di secernere proteine. Gli astrociti producono una serie di molecole inibitrici fra cui la semaforina 3<sup>o</sup>, diverse efrine e il fattore di slit, molecole che svolgono la loro principale funzione durante l'accrescimento neurale nell'embrione come controparte alle molecole chemioattrattive definendo dei blocchi oltre i quali gli assoni non possono crescere e che dopo una lesione determinano deformazioni bulbose all'estremità degli assoni in ricrescita (Figura 1.2). Gli oligodendrociti generano invece mielina, glicoproteine associate alla mielina (MAG) anch'esse in grado di bloccare la crescita degli assoni, e il Nogo-A, proteina prodotta solo da queste cellule ma il cui effetto inibitore non è stato ancora compreso. Anche gli spazi extracellulari della cicatrice sono presenti molti fattori inibitori, come la tenascina e i proteoglicani condroitin solfato.



**Figura 1.2** Risposta a una lesione a una cellula del tessuto nervoso. I cambiamenti cellulari che avvengono sono la demielinizzazione, la rimozione dei detriti da parte degli astrociti e della microglia, il rilascio di fattori inibitori da parte di queste cellule e dalla oligodendroglia con la conseguente deformazione bulbosa dell'assone.

Le ragioni per cui l'ambiente sia così sfavorevole alla rigenerazione sono ancora oscure: un'ipotesi speculativa è che l'encefalo sia portato a favorire la presenza di circuiti stabili, cercando quindi di ostacolare la formazione di nuove connessioni.

### 1.3 Tecniche terapeutiche

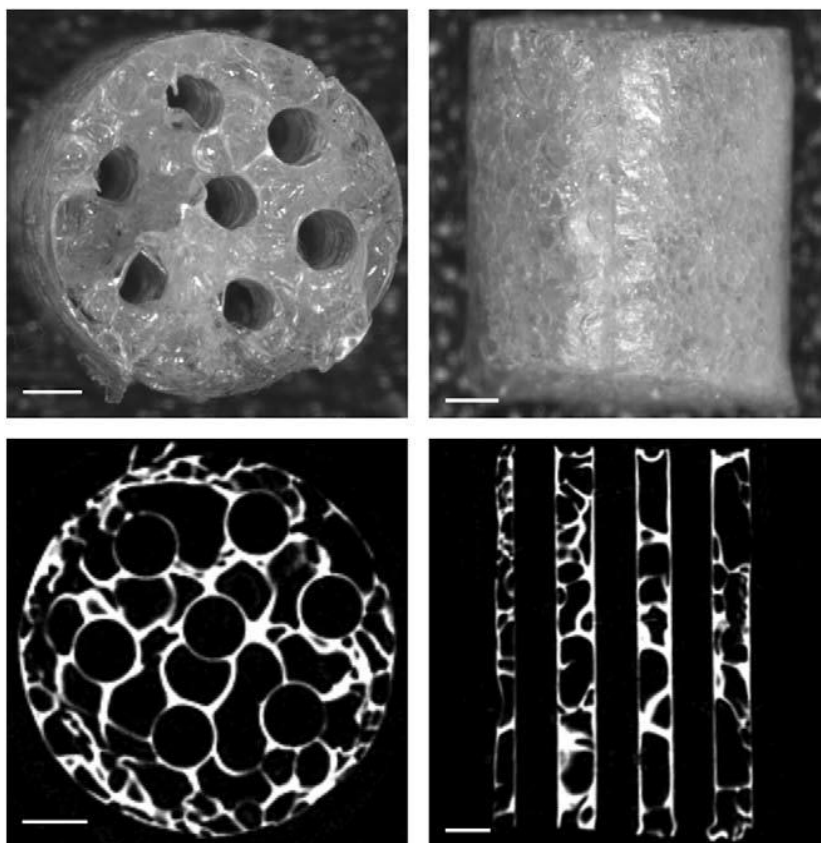
La tecnica standard per ripristinare una lesione neurale sia nel caso di danni al SNC che al SNP è il trapianto autologo, ovvero il trapianto di tessuti neurali presi da una zona non danneggiata.

Sebbene questo metodo sia considerato il "gold standard" offrendo generalmente i migliori risultati presenta degli svantaggi non indifferenti: il più importante è sicuramente il sacrificio di un tessuto sano, con la conseguente perdita permanente della funzione sensoriale nella zona donatrice e aumento dei tempi di convalescenza, altre cicatrici e disagi per il paziente.

Un altro problema è il *size mismatching*, difficilmente infatti le grandezze del tessuto preso dal sito donatore corrispondono con quelle del sito lesionato. Inevitabili sono anche la formazione di neuromi e la mancanza di ripristino totale.

Il trapianto allogenico, con tessuti isolati da cadaveri, non ha limiti in quanto a disponibilità di donatori, ma causa il rigetto nell'ospite. Tentativi volti a limitare la reazione del tessuto ospite hanno diminuito la vitalità delle cellule del tessuto da impiantare, riducendone quindi la funzionalità.

Per questi motivi la ricerca scientifica si sta sviluppando nella direzione degli scaffold (figura 1.3), con l'obiettivo di creare degli scaffold multifunzionali che pareggino e superino le prestazioni del trapianto autologo, senza i problemi di trovare un sito donatore per un trapianto.



**Figura 1.3** esempio di scaffold multicanale in PLGA per innesto nel midollo spinale

# Capitolo 2

## Tipi di biomateriale usati come scaffold

### 2.1 Confronto fra biomateriali e proprietà richieste

Il sistema nervoso centrale (SNC) è un ambiente estremamente complesso e regolato da equilibri in buona parte ancora sconosciuti: per questo, ogni biomateriale destinato a un impianto nel SNC deve rispondere ad una lunga serie di requisiti, non solo per evitare di scatenare una reazione immunitaria, ma anche per garantire la necessaria funzionalità.

#### 2.1.1 Proprietà generali

Il materiale candidato per eventuali applicazioni a contatto con il SNC deve essere biocompatibile per evitare di generare reazioni negative da parte del sistema biologico; deve inoltre essere completamente biodegradabile poiché lo spazio nel SNC è estremamente limitato e l'uso di materiali non degradabili porterebbe alla compressione dei nervi, causando infiammazioni croniche. È preferibile che il materiale degradi con un'erosione superficiale rispetto ad una di bulk: l'erosione di tipo bulk, infatti, corrisponde ad una rapida perdita di massa che genera un picco nella risposta del tessuto con l'aumento dei linfociti e del tessuto fibrotico. Con l'erosione superficiale la stabilità strutturale si

mantiene più a lungo e viene fornita una guida migliore alla crescita degli assoni.

### 2.1.2 Tempo di degradazione

Il tempo di degradazione è un parametro da tenere in debita considerazione. Idealmente uno scaffold dovrebbe degradare nello stesso tempo in cui si forma la matrice extracellulare per evitare compressioni o laschi nella zona fra l'impianto e il tessuto. D'altro canto, una degradazione rapida può essere utile a rilasciare sostanze immunosoppressive, mentre una degradazione lenta serve a proteggere le cellule inglobate fino alla fine dell'infiammazione acuta, o a diluire nel tempo il rilascio di una sostanza.

Alcuni biomateriali permettono un'accurata programmazione dei tempi di degradazione, in particolare gli idrogel permettono l'aggiunta di monomeri degradabili, i poly( $\alpha$ -hydroxy-acids) (acido poli-lattico, poli-glicolico o policaprolattone) per promuovere la separazione dei monomeri quando i legami sono idrolizzati, oppure di specifici peptidi fra i macromeri: in questo modo l'idrogel degrada in presenza di uno specifico enzima nel tessuto. Ad esempio negli idrogel composti da acidi poli-lattico o poli-glicolico i legami esterei fra questi prodotti vengono idrolizzati, generando acido lattico o glicolico, facilmente riassorbibili dall'organismo

### 2.1.3 Idrogel naturali e sintetici

Gli idrogel presentano numerose altre caratteristiche che li rendono ottimi materiali impiantabili. Data la loro natura idrofilica hanno un alto contenuto d'acqua (> 90%) che favorisce la coltura cellulare; inoltre offrono una vastità di caratteristiche meccaniche per cui possono essere progettati per mimare molti tessuti organici come tessuti molli, tessuti duri o vasi sanguigni. La stessa matrice extracellulare del cervello, come quella di molti altri tessuti ed organi, è un polimero altamente idratante composto da acido ialuronico.

Gli idrogel si possono raggruppare in due grandi classi: naturali e sintetici. Fra gli idrogel naturali, il più usato è l'agarosio, un polisaccaride ricavato dalla Rhodophyta (alga rossa). L'agarosio offre numerose proprietà: innanzitutto è biocompatibile, non evoca risposte immunitarie o infiammatorie, è stabile per almeno un mese dall'impianto, ha proprietà fisiche compatibili con il midollo osseo, incorpora facilmente proteine e glicosamminoglicani con legami covalenti sui gruppi funzionali o nelle catene di polisaccaride e fornisce un'ottima guida non permettendo l'attraversamento trasversale da parte degli assoni.

Tuttavia gli idrogel naturali sono difficili da definire chimicamente a causa della complessità delle molecole da cui sono composti; per contro quelli sintetici sono meglio definiti chimicamente: conseguentemente la polimerizzazione e la degradazione possono essere controllate più precisamente, i dati in vitro sono meno variabili e la risposta immunitaria è minore. Il più importante idrogel sintetico è il *glicole polietilenico* (PEG) che offre una grandissima varietà di configurazioni e può essere progettato per rilasciare fattori terapeutici per settimane o mesi.

#### 2.1.4 Collagene

Il collagene è un biomateriale naturale molto usato per la sua bassa antigenicità, eccellenti biocompatibilità e biodegradabilità, capacità di trasporto di fattori neurotrofici, capacità di favorire la migrazione cellulare e di dirigere la crescita degli assoni lungo i suoi canali ordinati (aptotassi). Il più usato nel campo dell'impianto neurale è il collagene di tipo I, che può essere ricavato dalla pelle bovina mediante trattamento enzimatico e chimico per rimuovere tutte le componenti non pure. Tuttavia alcuni studi hanno dimostrato che le cellule del midollo spinale hanno difficoltà a crescere in scaffold di collagene e che questi scaffold, a differenza di quanto fanno nel sistema nervoso periferico, diminuiscono il numero di fibre nervose che possono svilupparsi all'interno dell'impianto. Si è supposto che questo sia dovuto alla struttura del collagene



che non fornisce un adeguato sostegno agli assoni. Questo effetto inibitore è mitigato dall'aggiunta di fattori di crescita allo scaffold.

### 2.1.5 Polipirrolo

La capacità di condurre corrente elettrica ha dimostrato di favorire la rigenerazione delle cellule del SNC: esperimenti condotti impiantando scaffold di polipirrolo nel nervo sciatico di topi si sono dimostrati promettenti. Il polipirrolo non solo conduce elettricità ma ha anche proprietà antiossidanti: è quindi capace di eliminare i radicali liberi minimizzando la formazione di cicatrici. Sul meccanismo con cui i materiali conduttori stimolino la rigenerazione sono state formulate solo alcune ipotesi. Un ruolo può essere giocato dall'elettroforesi, cioè la capacità di attrarre particelle cariche elettricamente sospese in un liquido, che ridistribuisce i recettori superficiali sulla cellula, attiva i processi di crescita e altera l'assorbimento delle proteine. Nonostante i vantaggi che il polipirrolo e polimeri simili offrono, la mancanza di biodegradabilità, le scarse proprietà meccaniche e problemi di compatibilità in sistemi biologici ne precludono un ampio utilizzo, rendendolo utilizzabile solo in materiali compositi.

## 2.2 Proprietà strutturali

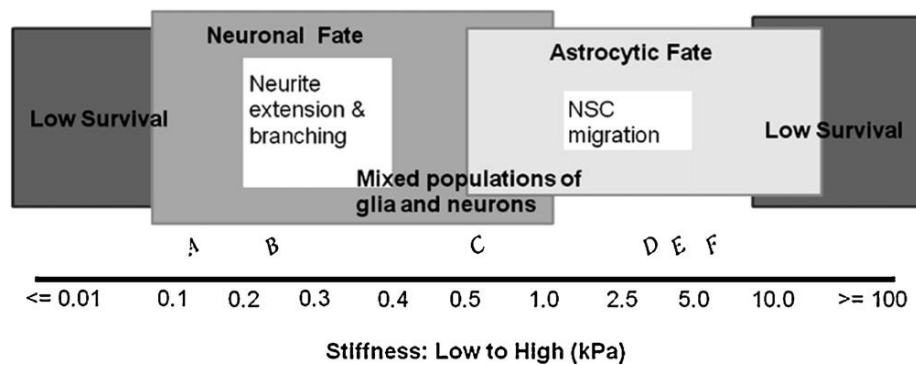
Nella progettazione di un impianto, particolare attenzione va posta alle caratteristiche meccaniche e fisiche del materiale utilizzato, alla struttura microscopica e all'architettura globale. Queste sono condizioni fondamentali per la realizzazione di un impianto funzionale anche nel caso della rigenerazione neurale dove, pur non essendo necessario un materiale che resista a sollecitazioni particolarmente elevate, devono essere studiate attentamente al fine di fornire il miglior ambiente possibile allo sviluppo delle cellule. Il materiale infatti deve garantire la sopravvivenza e la funzionalità delle cellule incapsulate al suo interno e al contempo fornire un supporto fisico e una guida per la crescita delle cellule del tessuto ospite.

### 2.2.1 Modulo di compressione

Una delle principali caratteristiche da considerare nella scelta di un biomateriale per l'impianto è il modulo di compressione, in altre parole la capacità di resistere ad una forza di compressione uniforme. Da questo punto di vista i polimeri forniscono un notevole vantaggio rispetto ad altri biomateriali: infatti il modulo di compressione dipende direttamente dalla densità dei cross-link fra i monomeri precursori e può quindi essere cambiato variandone la percentuale. Un altro sistema per regolare il modulo di compressione è modificare i monomeri, aumentandone il peso molecolare o agendo sui loro gruppi funzionali, come l'acrilato, il tiolo o i poliesteri, che alternano il numero dei cross-link e la loro lunghezza.

Il modulo di compressione influisce in maniera diversa su diversi tipi di cellula (Figura 2.1): ad esempio, mentre gli osteoblasti hanno bisogno di un modulo di compressione alto, simile a quello dell'osso mineralizzato, i neuroni danno migliori risultati su un substrato con modulo basso, da 0.1 a 1 kPa, minore del modulo di compressione medio del cervello, misurato da Lampe et al. con un valore compreso fra i 2.6 e i 5.7 kPa. Altre cellule neurali, gli astrociti e gli oligodendrociti preferiscono un ambiente relativamente più rigido, con un modulo che varia fra gli 0.5 e i 10 kPa. Una maggior rigidità aumenta anche l'espressione genica delle proteine dell'ECM legate alla formazione di cellule gliali.

Essendo dipendente dai cross-link, il modulo di compressione decresce con la degradazione del polimero, ovvero a seguito della rottura dei legami e quindi della perdita di stabilità meccanica. Questo fenomeno può essere sfruttato progettando i tempi di degradazione in modo che siano simili ai tempi richiesti per formazione della nuova ECM: in questo modo il tessuto autologo rimpiazza l'impianto mentre questo si degrada.



**Figura 2.1:** La sopravvivenza e il destino delle cellule staminali nervose (CSN) cambiano in funzione della rigidità del materiale. Le cellule nervose non crescono bene in materiali troppo poco o troppo rigidi. Le cellule che sopravvivono a rigidità più basse tendono a svilupparsi come cellule neuronali, a rigidità più alte come astrociti. L'estensione e la ramificazione dei neuriti avvengono a rigidità minori, mentre la migrazione delle CSN a rigidità leggermente più elevate. A) cellule di topo a 6 giorni dalla nascita sviluppate per il 50% in neuroni, 25% astrociti, 15% oligodendrociti, e 10% rimaste indifferenziate. B) e C) i neuroni spinali sensoriali hanno lunghe estensioni dei neuriti, ma la ramificazione è favorita su materiali più morbidi (B) rispetto ai più rigidi (C), mentre la sopravvivenza degli astrociti è scarsa in entrambi i materiali. (D-F) NSC embrionali ricavate dal mesencefalo dopo 13.5 giorni, a 24h dall'incapsulazione hanno 54% di sopravvissuti con sfere di micro popolazioni miste di neuroni e astrociti (D), 47% sopravvissuti (E), e 31% di sopravvissuti (F). Dopo 21 giorni nessuna NSC è sopravvissuta nell'idrogel più rigido (F).

La polimerizzazione *in situ* permette al materiale di assumere la forma esatta della zona lesionata, anche quando questa ha la forma amorfa tipica delle lesioni del cervello, a causa delle notevoli problematiche legate a questo processo, è comunque preferito l'uso di biomateriali con il modulo di compressione molto basso piuttosto che ai monomeri non polimerizzati.

## 2.2.2 Grandezza della maglia

Un altro parametro di grande importanza è la grandezza della maglia, una grandezza fisica nanometrica definita come la distanza fra i punti di cross-link di un polimero, ed ha misure che variano solitamente dai 10 ai 150 Å. Oltre a contribuire alle proprietà meccaniche come la resistenza e la rigidità, la grandezza di maglia influisce soprattutto sul comportamento delle cellule incapsulate nel polimero in quanto le cellule hanno bisogno di scambiare nutrienti e cataboliti con l'ambiente esterno e la grandezza di maglia regola il tasso di diffusione. Polimeri con maglie grandi favoriscono il passaggio di molte

molecole, mentre le maglie piccole lo ostacolano. L'acqua ha una molecola di circa  $2\text{\AA}$  e riesce facilmente a diffondere dentro e fuori il polimero, aumentando così l'idrolisi e quindi la degradazione. Con la rottura dei legami le maglie si allargano, permettendo il passaggio di proteine e molecole più grandi. Con un'accurata programmazione della degradazione si può fare in modo che il polimero si degradi solo finita la fase di infiammazione acuta che segue l'impianto nel tessuto ospite: in questo modo le molecole incapsulate non risentono dell'attacco da parte del sistema immunitario.

Tenendo conto di questi fattori, le strutture composte da nanofibre offrono grandi prospettive per il futuro in quanto hanno una grande somiglianza strutturale con l'ECM, un'ottima resistenza meccanica e un alto rapporto area volume che le rende particolarmente adatte alla rigenerazione neurale. Scaffold di nanofibre di poli-lattico-co-glicolico e poli-caprolattone (PCL/PLGA) hanno dimostrato di supportare la crescita neuronale lungo lesioni di 10 mm nel nervo ischiatico di topi.

### 2.2.3 Porosità

Anche l'architettura macroscopica, come la presenza di pori, può determinare la funzionalità del biomateriale nel tessuto, simulando gli spazi all'interno del tessuto necessari ad alcuni tipi di cellula. I pori si differenziano dalla maglia per la loro dimensione maggiore, dell'ordine del micron, e possono influenzare la crescita e l'orientamento delle cellule. Si può ad esempio creare una serie di pori interconnessi nel polimero per sviluppare la crescita dei neuriti all'interno dello scaffold, senza dover aspettare la degradazione. I pori si possono formare nel polimero per ragioni chimiche, come il peso molecolare dei monomeri, oppure possono essere creati artificialmente, inglobando durante la polimerizzazione altri polimeri con degradazione più rapida. Un'altra strategia per ottenere materiali con le stesse proprietà di un materiale poroso è di inglobare nel polimero microtubi di lipidi, come nell'esperimento svolto da Mahesh Chandra Dodla e Ravi V. Bellamkonda. Questi microtubi offrono un grande vantaggio

nell'inglobamento di fattori all'interno dello scaffold in quanto non necessitano di altri solventi all'infuori dell'acqua e facilitano il lento rilascio delle sostanze.

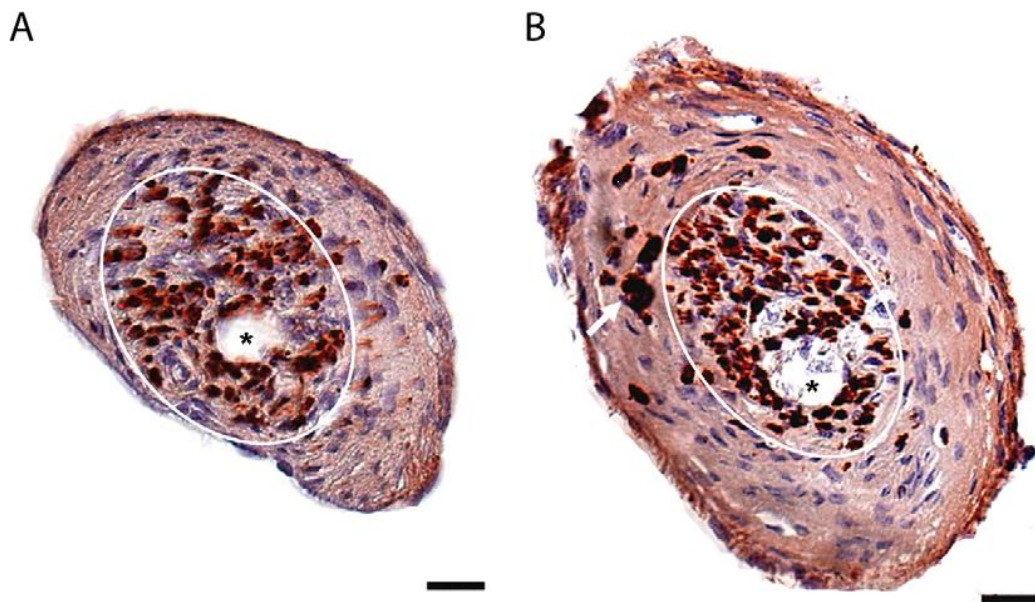
#### 2.2.4 Linearità

Nel caso di danni al midollo spinale, o comunque nella necessità di collegare due zone nervose distanti fra loro, numerosi esperimenti hanno dimostrato la superiorità dei risultati ottenuti con biomateriali dalla struttura strettamente lineare.

In assenza di un'organizzazione tridimensionale, infatti, la crescita degli assoni segue un ordine casuale, perdendo la tipica organizzazione fascicolare; conseguentemente c'è una notevole riduzione del numero di neuroni che riescono a formare collegamenti funzionali con i rispettivi recettori all'altro capo della lesione. Sebbene la realizzazione di scaffold strettamente lineari sia relativamente semplice su brevi distanze, per lunghezze paragonabili alle lesioni del midollo osseo umano (2-4 cm) la struttura lineare è fortemente soggetta alla degradazione, alla formazione di canali trasversali e quindi alla perdita di funzionalità. In alcuni studi si sono ottenuti buoni risultati con l'utilizzo di scaffold formati da fibre di polimeri lineari intrecciate fra loro.

Per fornire un'adeguata guida alla crescita degli assoni, la struttura lineare può essere realizzata anche a livello macroscopico mediante la formazione di canali allineati parallelamente all'interno dello scaffold. Tali canali hanno l'obiettivo di favorire la crescita ordinata degli assoni e di aumentare l'area della sezione dello scaffold. Nell'esperimento di Aaron J. Krych et al. gli scaffold sono stati fabbricati iniettando un composto liquido di lattide/glicolide in uno stampo di teflon seguito da un'estrazione a vuoto del solvente. L'esperimento dimostra come la grandezza dei canali influisca sul comportamento delle cellule: sono quindi stati realizzati canali da 450  $\mu\text{m}$  e da 660  $\mu\text{m}$  (Figura 2). I canali da 660  $\mu\text{m}$  sono i più grandi realizzabili su uno scaffold di 3 mm di diametro mantenendone l'integrità, quelli da 450  $\mu\text{m}$  consentono un'area di sezione pari alla metà dei precedenti. I risultati dimostrano che non c'è significativa differenza fra le grandezze del nucleo rigenerativo dei due canali, ma che il

canale più grande provoca una crescita maggiore del tessuto fibroso. Si osserva anche un numero più elevato di assoni nei canali da 450 $\mu$ m, per contro un maggiore presenza di macrofagi in quelli da 660 $\mu$ m.



**Figura 2.2:** Sezione trasversale di canali da 450 $\mu$ m (A) e 660  $\mu$ m (B). In evidenza l'analisi al microscopio ottico dei neuro filamenti degli assoni (sezioni circolari color ruggine) nel nucleo rigenerativo (cerchiato in bianco). I profili degli assoni in rigenerazione non sono mai stati visti all'interno del tessuto fibroso. Le frecce bianche indicano gruppi di macrofagi visti all'interno del tessuto fibroso. Ogni canale contiene un capillare centrale(\*). Ingrandimento di 400X, Barra di scala 50 $\mu$ m.

# Capitolo 3

## Tecniche di fabbricazione degli scaffold

I metodi per la fabbricazione di scaffold impiantabili sono molti e dalle caratteristiche molto diverse. Per gli scaffold impiantabili nel sistema nervoso centrale le condizioni richieste sono principalmente due: l'assenza di solventi o residui organici che possono provocare reazioni infiammatorie, e condizioni di fabbricazione che minimizzino la perdita di funzionalità di eventuali fattori inglobati nello scaffold.

### 3.1. Freeze-dry

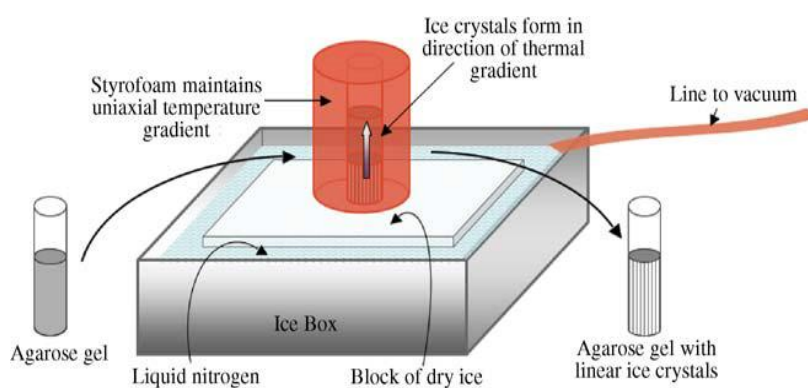
La tecnica di freeze-dry è un metodo di fabbricazione di scaffold alternativo rispetto ai classici *particulate-leaching*, *heatcompression* o *extrusion*, che, date le rigide condizioni a cui deve essere portato il materiale e all'uso di solventi richiesti risultano svantaggiosi per l'incorporazione di cellule o proteine. Il processo di freeze-dry sfrutta l'acqua presente all'interno del polimero, facendola ghiacciare per creare dei micro-cristalli che verranno poi fatti sublimare definendo così la microstruttura dell'impianto.

Il procedimento con cui avviene il congelamento dell'acqua nel polimero è essenziale per definire le proprietà meccaniche e strutturali dello scaffold che si sta realizzando, che dipendono dalla grandezza e dal numero dei cristalli di ghiaccio. Ad esempio, i pori di uno scaffold in chitosano hanno un diametro programmabile nel range 40-250 $\mu\text{m}$  variando la temperatura e quindi la velocità di congelamento: a temperature inferiori l'acqua congela più rapidamente formando più cristalli dal diametro minore; la grandezza dei pori si può anche ridurre aumentando la concentrazione del chitosano in soluzione.

Un metodo per creare scaffold tubolari con pori paralleli strutturati a nido d'ape è quello proposto da ShulaStokols e Mark H. Tuszynski, usando il metodo di freeze-dry sull'agarosio.

Nella prima fase si dissolve l'agarosio in acqua distillata a 100°C in concentrazione di 30 mg/ml, la soluzione viene iniettata in stampi tubolari di vetro che vengono centrifugati per rimuovere le bolle d'aria e poi fatti raffreddare a temperatura ambiente. La soluzione diventa così un gel che, al contrario della semplice soluzione di agarosio e acqua, permette ai cristalli di formarsi più lentamente e quindi di organizzarsi in forma di canali. I tubi in vetro sono quindi ricoperti di materiale isolante (Styrofoam), lasciando esposto solo il fondo dello stampo.

Per creare un gradiente termico uniassiale il tubo viene appoggiato su un blocco di ghiaccio secco a sua volta immerso in una vasca di azoto liquido; i vapori di azoto sono tolti da un aspiratore a vuoto (Figura 3.1). Dopo 45 minuti i cristalli di ghiaccio si sono estesi per tutto il polimero e a quel punto lo scaffold viene liofilizzato per una notte.

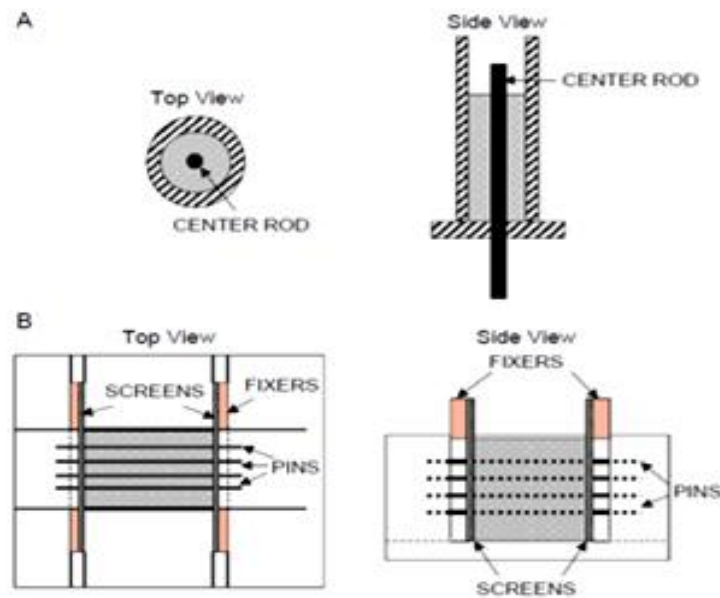


**Figura3.1:** Schema della tecnica di polimerizzazione freeze-dry.

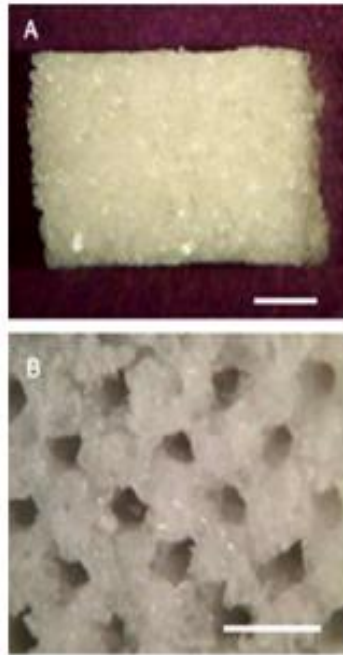


## 3.2. Gas foaming

Anche il processo di polimerizzazione *gas-foaming* non usa alte temperature o solventi organici ed è capace di creare scaffold altamente porosi senza arrivare a condizioni ambientali che potrebbero limitare l'attività di cellule o molecole inglobate. Particelle separate di polimero, solitamente PLG o PLGA usati come microsfeere per inglobare fattori o cellule, vengono miscelati con un fattore porogeno, tipicamente cloruro di sodio (NaCl), miscelati con piccole quantità di acqua deionizzata e inseriti dentro appositi stampi (Figure 3.2 e 3.3) che determinano le caratteristiche macroscopiche dello scaffold. A questo punto si porta la miscela ad alta pressione iniettando CO<sub>2</sub> a circa 55 atmosfere per 12-16 ore.



**Figura 3.2:** Schema degli stampi per la fabbricazione di scaffold (A) stampo per scaffold con un singolo canale conduttore con un'unica asta al centro (B) per scaffold a canali multipli lo stampo ha più perni che lo attraversano.



**Figura 3.3:**Scaffold a 18 canali in HMW PLG fabbricati con la tecnica del gas foaming (A) scaffold visto dall'alto (barra di scala =1 mm) e (B) dal fondo (barra di scala = 0.5mm).

La rapida rimozione della CO<sub>2</sub> provoca instabilità termodinamica, che causa l'espansione e la fusione delle particelle di polimero attorno a quelle del porogeno. Il porogeno viene quindi eliminato mediante l'immersione dello scaffold in acqua distillata per circa 4 ore. La dimensione e la quantità dei pori possono essere controllati variando la percentuale di porogeno e la pressione del gas; è inoltre relativamente facile ottenere scaffold di grandi dimensioni.

Nella ricerca svolta da Yang Yang et al. per la creazione delle microsferi precursori dello scaffold è stata usata la tecnica criogenica a doppia emulsione. Una soluzione di saccarosio, *bovine serum albumin* (BSA), carbonato di magnesio MgCO<sub>3</sub> e NGF è stata aggiunta a una soluzione di PLG disciolta in diclorometano. La miscela è stata emulsionata tramite ultrasuoni e la parte acquosa congelata mediante immersione in azoto liquido. Una soluzione di alcol polivinilico (PVA) è stata aggiunta alla miscela, e quindi il composto riemulsionato mediante omogeneizzazione a 5000 rpm per 15 secondi. La soluzione ottenuta, diluita in PVA, è stata mescolata a temperatura ambiente per

3ore. Con una separazione di fase per centrifugazione sono state raccolte le microsfele, lavate con acqua deionizzata e liofilizzate per una notte.

### **3.3. Injecton molding, solvent evaporation**

Un'altra tecnica che permette di ottenere scaffold con canali paralleli è la semplice iniezione in uno stampo di una soluzione molto concentrata del polimero richiesto disciolto in un solvente, tipicamente diclorometano. La soluzione viscosa viene iniettata in uno stampo, che può essere ad esempio di Teflon o di acciaio inossidabile, leggermente lubrificato per facilitare la successiva rimozione. Gli stampi pieni di polimero vengono asciugati con una pompa a vuoto spinto, che rimuove il solvente e lo condensa in un'apposita sezione. La rimozione del solvente crea dei pori sulla parete dello scaffold. Una volta asciugato, e quindi solidificato, lo scaffold viene rimosso dallo stampo, lavato in etanolo per rimuovere i residui di lubrificante e di nuovo sottoposto a vuoto spinto per togliere i vapori dell'etanolo.

Gli stampi degli scaffold possono essere dei semplici cilindri, oppure possono contenere dei fili per creare canali interni. È anche possibile produrre stampi mediante la tecnica di *solid freeform fabrication* (SFF): tale sistema prevede di partire da un'immagine virtuale in tre dimensioni dell'oggetto da riprodurre, ottenuta mediante CAD (*computer-aided design*) e di "stamparlo" sovrapponendo e incollando sottili sezioni di materiale. In questo modo si possono ottenere stampi molto complessi, capaci, ad esempio, di mimare la struttura del midollo spinale umano.

### **3.4. Liquid-liquid phase separation**

Per creare scaffold con una microstruttura tubolare il gruppo di F. Yang ha usato la tecnica di separazione di fase liquido-liquido usando come polimero il PLLA. Il polimero è stato sciolto in tetraidrofurano (THF). La soluzione è stata scaldata a 50°C, poi velocemente iniettata in una piastra di Petri e raffreddata a -30°C per circa 2 ore, in questo modo la soluzione assume la consistenza di gel. Il gel è

stato purificato dal solvente mediante immersioni in acqua distillata per 2 giorni, i campioni risultanti sono quindi stati trattati con il metodo di freeze-dry. È possibile creare scaffold porosi formati da nanotubi che mimano la struttura dell'ECM con la tecnica della separazione di fase liquido-liquido, ma è molto difficile mantenere costante il diametro delle fibre e il loro verso.

### **3.5. Electrospinning**

Questa tecnica usa cariche elettriche per allungare e determinare la forma di filamenti di polimeri liquidi, come il collagene, il PLGA, o il PCL, emessi da una pompa a siringa senza l'utilizzo di alte temperature o solventi organici: può quindi essere usata anche su polimeri che degraderebbero alle temperature necessarie ad un altro metodo di fabbricazione. Il solvente evapora dal filamento mentre questo si trova in aria; il filamento si deposita quindi su un piatto o un'asta posta elettricamente a terra, oppure su di un apposito mandrino in modo da ottenere una struttura a fibre ordinate e parallele oppure a disposizione casuale.

Le fibre così ottenute hanno un diametro regolabile fra i 50 nm e i 30 $\mu$ m ed hanno proprietà che si avvicinano molto a quelle dall'ECM come l'alta porosità e il notevole rapporto superficie/volume.

Due sono i fattori determinanti nel processo di elettrospinning: il primo è l'insieme dei parametri del sistema, quali il peso molecolare del polimero, la distribuzione del peso molecolare, la viscosità e la conduttività della soluzione; il secondo sono i parametri del processo, ad esempio la velocità di emissione della soluzione, il potenziale elettrico, la distanza fra la siringa e il collettore. Variando questi parametri si può determinare il diametro delle fibre e la loro disposizione.

Le fibre possono incapsulare farmaci o proteine, è stato dimostrato che scaffold composti da fibre allineate prodotti mediante elettrospinning favoriscono la rigenerazione di tratti di midollo spinale di 15 mm nei topi in tre mesi dall'impianto.

# Capitolo 4

## Rilascio di fattori terapeutici

Lo scopo degli scaffold è di creare e mantenere uno spazio per la crescita dei tessuti, fornendo una guida alla migrazione e un supporto all'adesione delle cellule. Tuttavia il tessuto nervoso è estremamente complesso, e numerosi fattori inibiscono la sua rigenerazione: per questo gli scaffold vengono funzionalizzati con l'aggiunta di sostanze da rilasciare nel tessuto, che possono andare dai fattori di crescita agli immunosoppressori, fino ad inglobare intere cellule neuronali.

La diffusione nel sito della lesione avviene mediante iniezione delle sostanze sospese in una soluzione di collagene, oppure attraverso l'inglobamento delle sostanze nello scaffold. Quest'ultimo metodo è generalmente preferito in quanto le iniezioni comportano ulteriori traumi nel tessuto, il rilascio è impulsivo e non costante nel tempo ed infine i fattori iniettati possono diffondere anche in altri tessuti sani causando effetti collaterali.

### 4.1. Fattori neurotrofici

Le attività delle cellule nervose viene regolata da una famiglia di proteine, le neurotrofine (NT), di grandissima importanza per quanto riguarda l'organizzazione, la sopravvivenza e la differenziazione delle cellule neurali.

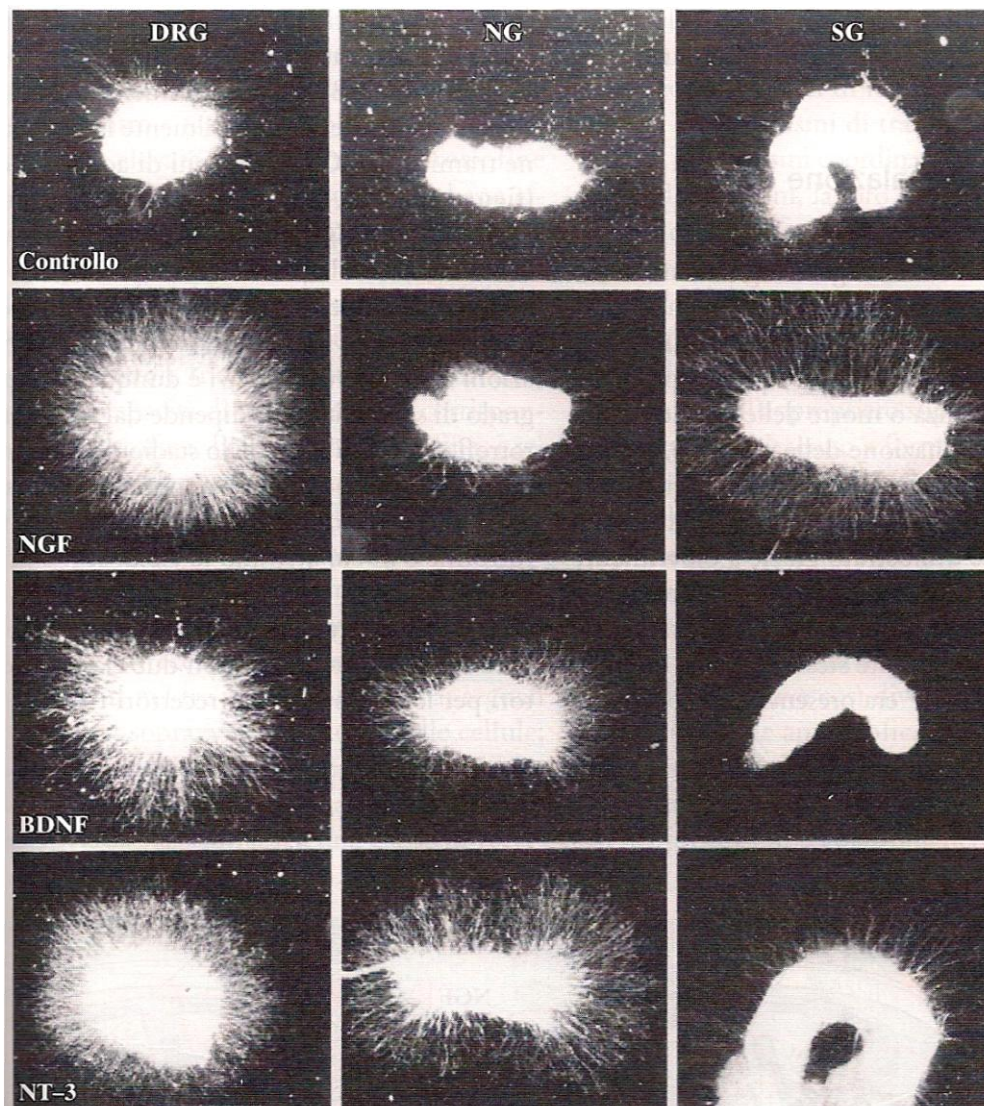
I principali fattori neurotrofici sono il *nerve growth factor* (NGF), il *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) e la *neurotrophin-3* (NT-3).

Nella giunzione neuromuscolare danneggiata i livelli di NGF e BDNF risultano fisiologicamente aumentati, questo fa supporre che siano responsabili della stimolazione delle vie di segnalazione tropiche e trofiche per favorire i processi di riconoscimento del bersaglio sinaptico e quindi la sinaptogenesi. La quantità di NT-3 risulta invece diminuita, essendo questa neurotrofina responsabile del mantenimento delle sinapsi, il suo calo potrebbe impedire che i siti sinaptici diventino refrattari al reinnervamento.

NT-3 e BDNF aumentano la sopravvivenza degli oligodendrociti e la mielinazione degli assoni, il BDNF diminuisce inoltre la risposta infiammatoria, diminuendo anche il numero degli astrociti, responsabili dello sviluppo della cicatrice gliale, ha un ruolo importante nella sinaptogenesi e nella differenziazione e intensifica la plasticità sinaptica.

Come si vede in figura 4.1, la capacità delle NT di stimolare la crescita nervosa varia a seconda delle cellule bersaglio, le NT-3 si dimostrano essere le neurotrofine più versatili, anche per la sua capacità di legarsi a più di un recettore.

Gli agenti possono essere legati direttamente allo scaffold polimerico, sia per sospensione che con legami covalenti, oppure possono essere inglobati in microparticelle di polimero che saranno successivamente impiantati nella matrice dello scaffold o nei canali guida



**Figura 4.1** Differenze degli effetti delle neurotrofine NGF, BDNF e NT-3 a seconda delle cellule bersaglio: nella prima colonna le cellule espianate dai gangli delle radici dorsali (DRG) sono stimolati alla produzioni di neuriti da tutti e tre i fattori; nella seconda le cellule dei gangli nodosi (NG), gangli sensoriali dei nervi cranici con un' origine embriologica diversa da quelli delle DRG, sono stimolati solo dal BDNF e dalla NT-3; nella terza colonna le cellule dei gangli simpatici producono neuriti solo se stimolate dai NGF o dalle NT-3.

## 4.2. Proteine dell'ECM

La matrice extracellulare è composta da un vario numero di molecole che interagiscono con le cellule e partecipano a numerosi processi durante la vita e lo sviluppo dell'organismo.

Le principali proteine dell'ECM sono il collagene, la fibronectina (FN), la laminina (LM) la tenascina e i proteoglicani.

Nell'ingegneria tissutale in particolare vengono usate la fibronectina e la laminina, per la loro grandissima varietà di effetti sulle cellule, fra cui l'incremento della capacità di adesione, necessaria per le successive fasi di sviluppo delle cellule, aumento della proliferazione, stimoli alla migrazione e alla differenziazione.

La laminina e la fibronectina oltre ad essere dei potenti stimolatori della crescita dei neuriti hanno dimostrato anche di avere capacità anti-apoptiche aumentando la sopravvivenza delle cellule nervose; essendo proteine coinvolte nei processi di formazione dei circuiti neurali in fase embrionale, durante la rigenerazione queste molecole indirizzano la crescita degli assoni verso i rispettivi bersagli.

Queste proteine possono essere inglobate nello scaffold o usate per funzionalizzarne la superficie, vengono inoltre prodotte spontaneamente dalle cellule inglobate nello scaffold.

## **4.3 Terapia cellulare**

Oltre al rilascio di molecole, è stato dimostrato essere di grande utilità la diffusione di cellule che svolgono particolare ruoli nella rigenerazione fisiologica dei nervi al fine di aumentare la capacità di rigenerazione del tessuto danneggiato. La terapia cellulare è limitata dalla scarsa sopravvivenza e attecchimento delle cellule impiantate, intorno al 15%.

### **4.3.1 Cellule di Schwann**

Sono i principali elementi cellulari del sistema nervoso periferico, responsabili della ricrescita e della reinnervazione degli assoni periferici, queste cellule sono responsabili della mielinazione, della secrezione di molecole di accrescimento e orientamento degli assoni e di componenti della ECM. Svolgono anche un ruolo durante il processo di degenerazione walleriana, il processo di riassorbimento



delle fibre nervose separate dai loro corpi, rimuovono infatti i detriti del assoplasma e assolemma.

Tipicamente, in prossimità di una lesione neuronale, le cellule di Schwann aumentano sulla loro superficie la quantità di molecole di adesione cellulare quali le N-CAM, le glicoproteine L1 e le N-caderine. Inoltre incrementano l'espressione e la secrezione di neurotrofine. Le cellule di Schwann determinano anche l'elevata espressione nei coni di accrescimento degli assoni dei fattori correlati alle neurotrofine, come il Trk e il P75.

Queste cellule possono essere facilmente sospese all'interno dei canali guida negli impianti in polimeri biodegradabili, e rimangono vitali una volta impiantate nella zona lesa.

Nonostante le SC abbiano dimostrato un grande potenziale rigenerativo(fig. 4.3), gli studi hanno dimostrato alcuni effetti collaterali, come l'inibizione della loro capacità di migrazione nel SNC, il ritardo del recupero funzionale, la possibilità che i percorsi neuronali formati seguano la configurazione del sistema nervoso periferico invece che centrale. Le cellule di Schwann hanno un periodo di sopravvivenza di 6 settimane dopo il trapianto.

#### 4.3.2 Cellule della guaina olfattiva (OECs)

Le cellule delle vie olfattive sono le uniche cellule nervose, insieme a quelle dell'ippocampo, a rigenerarsi e sostituirsi durante tutto il corso della vita. Anche queste cellule hanno dimostrato la capacità di promuovere la rigenerazione e il ripristino funzionale nelle lesioni al midollo osseo con velocità paragonabile a quelle delle SC: il loro compito è infatti quello di avvolgere e guidare i neuriti in crescita, raggruppandoli in fasci non mielinati, e una volta arrivate ai bulbi di stimolare l'interazione con gli astrociti. La caratteristica principale di queste cellule è di stimolare la crescita degli assoni dal SNC al SNP, grazie alla presenza in entrambe i tessuti. Le OECs hanno quindi proprietà simili alle cellule di Schwann e agli astrociti; in più le OECs trapiantate promuovono la migrazione di altre OECs nella lesione. Hanno un tempo di vita medio di 4 settimane dopo il trapianto.

Come le SC anche le OECs secernono molecole della ECM, in particolare il collagene di tipo IV e fattori neurotrofici quali NGF, BDNF e il *vascular endothelial growth factor* (VEGF). Le OECs inoltre riducono l'apoptosi delle cellule neuronali secondarie.

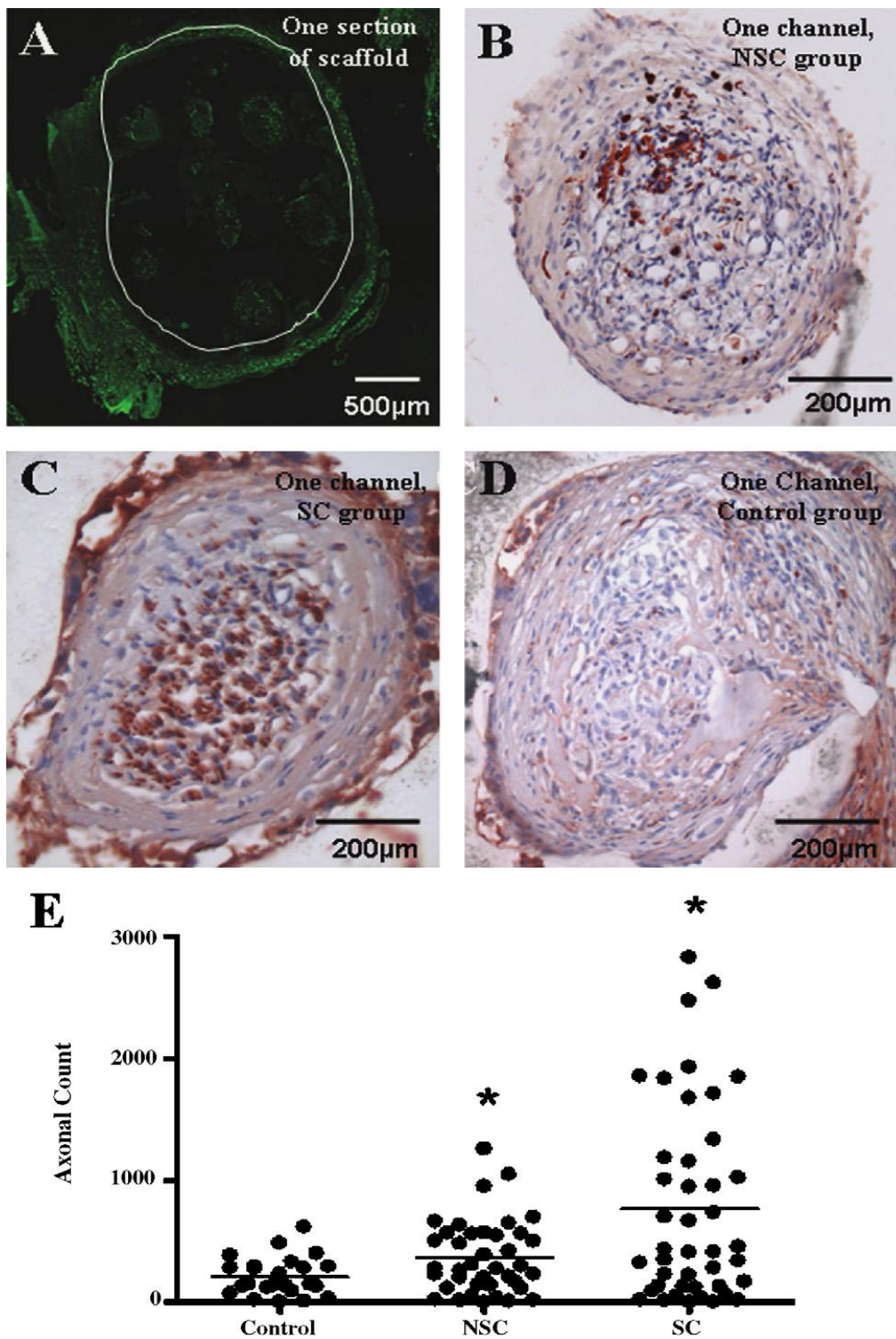
#### 4.3.3 Cellule nervose staminali

Sono cellule immature pluripotenti del sistema nervoso centrale in grado di auto-rinnovarsi; sono precursori degli astrociti, degli oligodendrociti e dei neuroni.

Le cellule staminali si trovano solo in determinate regioni, denominate "nicchie", che conservano proprietà ambientali specifiche. Per differenziarsi e migrare il tessuto rigenerante deve possedere la capacità di guidare la migrazione, le emissioni di neuriti e la sinaptogenesi di queste cellule, oltre a fornire un ambiente adatto alla loro adesione e sopravvivenza. Scaffold compositi, formati da componenti dell'ECM e fattori di crescita, possono fornire un adeguato substrato allo sviluppo di queste cellule. Sono in grado di rimielinare gli assoni già formati, di produrre fattori neurotrofici o di formare loro stesse dei circuiti neuronali, tuttavia i neuroni che si generano spontaneamente dalle cellule staminali non sono abbastanza robuste da ricreare l'intero tessuto danneggiato.

I problemi nell'impiego umano sono notevoli: la loro natura staminale pone il rischio di una differenziazione non controllata, con la possibilità di formare cellule non desiderate, quando vengono iniettate in zone lesionate. Infatti se non sono fornite di un adeguato substrato, tendono a prediligere la morfologia degli astrociti e a formare connessioni nervose che portano dolore al soggetto.

Lo svantaggio maggiore rimane comunque la difficoltà di ottenere tali cellule. Cellule staminali multipotenti sono ricavate da tessuti fetali, con i conseguenti problemi etici nel caso di trapianto autologo: una biopsia al cervello adulto, nell'ippocampo e nella zona sub ventricolare (SVZ) o al midollo spinale fornisce cellule ancora non differenziate, ma con una capacità di differenziazione molto minore.



**Figura.4.3:**Colorazione dei neuro filamenti di assoni in una sezione trasversale di uno scaffold di PLGA dopo un mese in vivo.(A) Immagine a microscopio a fluorescenza di una sezione trasversale di uno scaffold (in cui sono state inglobate NSC) tracciate con un anticorpo che evidenzia i neuro filamenti (B) sezione trasversale di un canale con cellule NSC (C) con cellule SC e (D) un gruppo di controllo. (E) Il grafico a punti evidenzia il numero di assoni per canale nei gruppi con NSC, SC o di controllo.

## 4.4. Terapia genica

Oltre a incorporare le sostanze da rilasciare nel biomateriale risulta utile modificare le cellule del tessuto o le cellule inglobate sfruttandole come “bioreattori” e spingendole a produrre le sostanze desiderate, nel caso specifico fattori neurotrofici.

La terapia genica consiste nel modificare il DNA delle cellule tessutali, portando geni specifici mediante vettori, che possono essere virus a cui viene modificato il DNA oppure microparticelle non virali. Vengono preferiti i vettori non virali per la loro maggiore sicurezza e per la possibilità di programmare i tempi di rilascio anche in maniera transiente, aumentando l’effetto rispetto al rilascio costante.

### 4.4.1. Vettori non-virali

Come per il rilascio di fattori, anche i vettori possono essere inglobati in microparticelle oppure legati allo scaffold. Il processo di inglobamento richiede che il vettore sia sottoposto a notevoli stress in quanto deve sopportare la liofilizzazione e la polimerizzazione con il rischio di essere reso inattivo; il legame con il polimero permette invece di legare i vettori anche a scaffold che hanno subito processi che altererebbero le loro proprietà, come polimerizzazioni ad alte temperature o in presenza di solventi. Le microparticelle possono essere lipidiche (lipoplessi), polimeri cationici (poliplessi) o ibride (lipopolilessi), e svolgono, oltre la funzione di trasporto e protezione del DNA, anche il compito di abbassare la carica negativa del DNA per facilitarne l’assorbimento da parte della cellula.

La lipoplessi è generalmente non tossica, ma ha una bassa espressione genica data la sua instabilità se iniettata *in vivo*; tuttavia il rilascio da un polimero ne aumenta la stabilità, con conseguente aumento delle cellule transfettate.

Il gruppo di Laura De Laporte ha creato le lipoplessi centrifugando i geni di DNA desiderati e un lipide, come ad esempio il Transfast e lasciando a incubare per 15-30 minuti. Ha quindi sperimentato tre tecniche di legame delle lipoplessi alla superficie degli scaffold in PLG: l’incubazione del DNA con il PLG

ricoperto da componenti dell'ECM quali il collagene-I, la laminina-I o la fibronectina, (incubazione), l'asciugatura delle componenti dell'ECM sul PLG e conseguentemente l'asciugamento del DNA sull'ECM (asciugamento in due fasi) oppure l'asciugamento diretto di proteine dell'ECM e DNA sulla superficie del polimero (asciugamento in una fase). Le molecole dell'ECM a rivestimento dello scaffold influenzano sensibilmente l'efficacia della terapia, la fibronectina incrementa il legame fra gli scaffold e i vettori del DNA con tutte e tre le tecniche di legame, mentre la laminina-I ottiene risultati simili solo con le tecniche di asciugatura, con una percentuale di vettori legati di circa l'80%. I migliori risultati di espressione genica si hanno invece con la fibronectina e la tecnica di incubazione con risultati di due ordini di grandezza superiori rispetto all'iniezione di plasmide e DNA non complessato.

Il ruolo della fibronectina nella transfettasi delle cellule non è chiaro: gli studi hanno dimostrato che la fibronectina riduce l'idrofobicità della superficie PLG, quindi riduce l'aggregazione del DNA rendendo più facile la transfettasi; aumenta inoltre la superficie di contatto fra le cellule e il polimero, aumentando la probabilità di assorbimento del DNA; infine favorisce la proliferazione cellulare.

#### 4.4.2. Vettori virali

L'approccio classico della terapia genica rimane comunque l'uso di virus appositamente modificati per inserire specifici geni nelle cellule del tessuto.

Per le cellule neurali vengono usati i lentivirus, una sottofamiglia dei retrovirus che, per via della capacità di transfettare anche cellule che non si dividono, quali appunto i neuroni, sono i migliori candidati per lo scopo.

Nonostante i rischi nell'inserire vettori virali in una lesione, i lentivirus rappresentano un metodo valido per la diffusione di geni. Sebbene dopo una settimana dall'impianto l'espressione genica ottenuta usando lipoplessi sia circa 5 volte superiore a quella ottenuta con i lentivirus nel raggio di 0.5 cm dallo scaffold, i lentivirus hanno dimostrato di avere un raggio d'azione doppio

rispetto alle lipoplessi e una persistenza nel tempo molto maggiore. Non mostrano inoltre aumento dell'inflammazione o della presenza di macrofagi.

## 4.5 Agenti anti inibitori

I numerosi fenomeni che inibiscono la rigenerazione nervosa possono essere parzialmente attenuati con agenti mirati a bloccare la diffusione delle molecole responsabili. Ad esempio i proteoglicani condroitin solfati (*chondroitin sulfate proteoglycans* CSPGs) sono stati identificati come una barriera chiave alla rigenerazione assonale. L'applicazione di *condroitinase ABC* nel sito della lesione degrada i CSPGs e l'acido ialuronico, demolendo quindi parte della cicatrice gliale e aumentando significativamente la rigenerazione. Anche la presenza di molecole inibitrici associate alla mielina è un limite alla ricrescita degli assoni: fra queste le principali sono il Nogo-A, le glicoproteine associate alla mielina (MAG), e le *oligodendrocyte-myelin glycoproteine*(OMgp). L'attività di queste molecole è mediata dai complessi di recettori, come i recettori del Nogo-A (NgR) e i corecettori associati, il p75/TROY e L-1. A valle del recettore NgR si trovano i recettori dei fattori di crescita epidermici (EGFR), di conseguenza bloccando l'EGFR si bloccano gli inibitori della crescita dei neuriti mielino-dipendi. Il diretto inibitore dell'EGFR è l'anticorpo monoclonale 1511gG. In un esperimento condotto da Qianqian Han et al. questo anticorpo è stato covalentemente legato a scaffold di collagene usati come vettori per il rilascio costante nel tempo. I risultati mostrano che la risposta spinale agli stimoli somatosensoriali è doppia nei soggetti trattati con scaffold covalentemente legati con l'anticorpo 1511gG rispetto che agli scaffold senza questo fattore.

# Capitolo 5

## Conclusioni

Le lesioni al midollo spinale e al cervello sono ancora oggi un evento che segna drammaticamente la vita del lesionato, a causa dei gravi problemi che arreca alle capacità motorie, di coordinazione e nei casi peggiori di espressione e di pensiero. La terapia per il ristabilimento è lunga e complessa, dagli esiti spesso incerti e senza mai un completo ripristino delle capacità.

La ricerca sugli scaffold per innesti nel SNC cerca di proporre un'alternativa al trapianto autologo che, benché dia i risultati migliori fra i metodi disponibili, offre comunque al massimo un ripristino parziale, e si rivela alle volte inefficace, andando comunque a sacrificare tessuti sani.

I meccanismi di funzionamento del SNC sono ancora in buona parte oscuri; la complessità nel rapporto fra le cellule che lo compongono e la vastissima gamma di molecole che ne determinano i comportamenti, rendono l'intervento dall'esterno su questo sistema una sfida clinica tutt'ora irrisolta.

A differenza del fegato o di altri organi interni, il SNC non mostra capacità di rigenerazione spontanea, ostacola anzi la formazione di nuovi circuiti nervosi: il primo obiettivo della ricerca è quindi quello di comprendere i meccanismi con i quali il SNC ostacola la riproduzione delle cellule nervose, in modo da poter bloccare i fattori inibitori. Alcuni passi sono stati mossi in questa direzione, ma i risultati dell'intervento esterno si dimostrano ancora incerti e ambigui, a causa dei compiti polivalenti che svolgono le molecole ed i recettori, spesso coinvolti sia nel processo di rigenerazione neurale che in quello di formazione delle cicatrici gliali.

È inoltre indispensabile lo studio accurato dello scaffold, che deve svolgere non solo la funzione di sostegno e guida per le cellule del tessuto ospite, ma deve

anche fornire fattori di crescita, di adesione, molecole per favorire e guidare la differenziazione delle cellule staminali e fattori anti inibitori, oltre che a cellule nervose staminali o del SNP. Questi fattori devono avere un tempo di rilascio accuratamente programmato: immettere nel sistema fattori con tempistiche sbagliate può portare alla perdita di funzionalità dello scaffold, se non addirittura a reazioni opposte a quella desiderata, con infiammazioni croniche che provocano dolore permanente nel paziente.

I risultati degli esperimenti svolti sui topi sono incoraggianti, in quanto dimostrano che la rigenerazione dei nervi del SNC è possibile; rimane comunque un grande lavoro da fare per trovare la combinazione ottimale di materiali, sostanze e cellule.



## Glossario

- Astrocita: piccola cellula gliale, dotata di numerose propaggini che circondano le aree sinaptiche, oltre a comporre la nevroglia svolge un ruolo nel rilascio, trasporto e ricezione dei neurotrasmettitori.
- Barriera emato-encefalica: è un'unità anatomico-funzionale realizzata dalle cellule endoteliali che compongono i vasi sanguigni del sistema nervoso centrale. Il suo scopo principale è di proteggere il tessuto nervoso dalle sostanze nocive presenti nel sangue, lasciando tuttavia passare le sostanze necessarie al metabolismo.
- Cisti: cavità corporea abnorme munita di pareti proprie, a contenuto solido, semisolido o liquido.
- Citosol: fluido della cellula all'interno della plasmembrana, costituito dalla regione del citoplasma che non contiene nessun organello.
- Degenerazione walleriana: processo di degenerazione e riassorbimento a cui va incontro il tratto periferico di un nervo interrotto a causa di traumi, ferite o trazioni, complementare alla degenerazione retrograda relativa al moncone centrale. Inizia con la rapida degradazione dell'assolemma (membrana plasmatica dell'assone) e assoplasma (citoplasma interno all'assone), seguita dalla formazione di residui degli assoni e della mielina, che vengono riassorbiti dalle cellule di Schwann e dai macrofagi che invadono il sito leso.
- Edema: abnorme accumulo di liquido nell'interstizio dei tessuti.
- Fattore di crescita dei fibroblasti (FGF): ampia famiglia di proteine che regolano il processo di proliferazione, differenziamento e migrazione cellulare in diversi tessuti.
- Fattore di crescita insulino-simile (IGF-1): i fattori di crescita più abbondanti prodotti dagli osteoblasti, inducono attività di crescita soprattutto nell'osso, ma sono in grado di svolgere anche altre funzioni.
- Fattore di crescita trasformante (TGF): la famiglia più numerosa di fattori di crescita prodotti dagli osteoblasti umani, che hanno un meccanismo d'attivazione complesso, che prevede il legame contemporaneo con due recettori presenti sulla membrana cellulare.
- Fibroblasto: cellule connettivali, in grado di produrre i componenti della matrice extracellulare.

- Gliosi: processo di proliferazione degli astrociti nelle aree danneggiate del sistema nervoso centrale che porta alla formazione della cicatrice gliale.
- Glutammato (acido glutammico): un amminoacido polare, sintetizzato dall'organismo. È coinvolto nella sintesi proteica e nel sistema nervoso svolge la funzione di neurotrasmettitore eccitatorio.
- Granulociti neutrofili: sottocategoria dei globuli bianchi caratterizzati dalla presenza di granulazioni nel citoplasma. Hanno funzione di difesa dell'organismo da infezioni batteriche e fungine.
- Linfociti: sottocategoria dei globuli bianchi, svolgono un ruolo primario nella risposta immunitaria e presentano diverse funzioni nel controllo della risposta all'antigene.
- Microglia: varietà di nevroglia costituita da cellule con brevi prolungamenti citoplasmatici. Si collocano nel sistema nervoso centrale durante la vita fetale. Caratteristiche della microglia sono le cellule microgliali.
- Mielina: sostanza costituita per il 70-80% da lipidi e per il 20-30% da proteine, che riveste come una guaina le fibre nervose, con funzione protettiva e isolante della conduzione dello stimolo nervoso tra cilindri vicini.
- Molecole di adesione cellulare N-CAM: proteine appartenenti alla super famiglia delle immunoglobuline (Ig SF) sono molecole di adesione cellulare espresse soprattutto dalle cellule nervose. Realizzano l'adesione fra cellule detta omotipica, in quanto le molecole localizzate sulla superficie delle due cellule adiacenti appartengono alla stessa famiglia.
- Monociti: i globuli bianchi più voluminosi, sono in grado di migrare all'esterno dei vasi sanguigni (extravasazione leucocitaria) fino ai tessuti, dove maturano in macrofagi.
- N-caderine: sottoclasse relativa alle cellule nervose delle caderine. Le caderine sono proteine di membrana presenti nelle cellule eucariotiche, appartenente a una famiglia di molecole di adesione. Le caderine hanno un ruolo chiave nella caratterizzazione della struttura dei tessuti e nei processi differenziativi durante lo sviluppo.
- Nevroglia: lo stroma interstiziale dell'encefalo e del midollo spinale, che, a differenza di quanto avviene negli altri organi, non è formato dal tessuto connettivo. È costituita da elementi di origine ectodermica (astrociti, oligodendrociti, cellule di Schwann) e di origine mesenchimale (microglia). Ha funzione di sostegno, trofica, di difesa e di riparazione.

- Oligodendrociti: cellule della nevroglia caratterizzate dalle piccole dimensioni e dalle piccole e poco numerose estensioni citoplasmatiche. Hanno il compito principale di mielinizzazione degli assoni del SNC, svolgendo un compito simile alle cellule di Schwann nel SNP, ma anche su più assoni contemporaneamente.
- Parenchima: il tessuto specifico di qualsiasi organo, contrapposto al tessuto connettivo di sostegno (stroma).
- Siringomielia: malattia del midollo spinale, caratterizzata dal progressivo sviluppo di una cavità nella sostanza grigia (siringa) costituita da una o più cisti.
- Trombosi: condizione morbosa caratterizzata dalla formazione di un trombo, cioè di una massa solida derivata dal sangue e presente a livello di un vaso del distretto arterioso o venoso
- Vasospasmo: contrazione improvvisa e prolungata della muscolatura liscia della parete di uno o più vasi sanguigni arteriosi con conseguente riduzione più o meno marcata del flusso sanguigno e spesso alterazioni strutturali permanenti nei tessuti scarsamente irrorati

## **Bibliografia**

**[1]Adult cell therapy for brain neuronal damages and the role of tissue engineering**

Gaetan J.-R. Delcroix, Paul C. Schiller, Jean-Pierre Benoit , Claudia N. Montero-Menei  
Biomaterials 31 (2010) 2105–2120

**[2]Animal models of spinal cord injury for evaluation of tissue engineering treatment strategies**

R. Talac, J.A. Friedman, M.J. Moore, L. Lu, E. Jabbari, A.J. Windebank, B.L. Currier, M.J. Yaszemski  
Biomaterials 25 (2004) 1505–1510

**[3]A three-dimensional nanofibrous scaffold for cartilage tissue engineering using human mesenchymal stem cells**

Wan-JuLia, Richard Tulia, ChukwukaOkafora, AssiaDerfoula, Keith G. Danielsonb, David J. Halla, Rocky S. Tuana,  
Biomaterials 26 (2005) 599–609

**[4]Biocompatibility analysis of poly(glycerol sebacate) as a nerve guide material**

Sundback CA, Shyu JY, Wang Y, Faquin WC, Langer RS, Vacanti JP, Hadlock TA  
Biomaterials 26 (2005) 5454–5464

**[5]Brain sweet brain**

Importance of sugars for the cerebral microenvironment and tumor development  
Thereza Quirico-Santos<sup>1</sup>, Clovis O. Fonseca<sup>2</sup>, JussaraLagrota-Candido  
ArqNeuropsiquiatr 2010;68(5):799-803

**[6]Current tissue engineering and novel therapeutic approaches to axonal regeneration following spinal cord injury using polymer scaffolds**

Nicolas N. Madigana, Siobhan McMahonb, Timothy O'Brienb, Michael J. Yaszemskic,Anthony J. Windebanka  
Respiratory Physiology & Neurobiology 169 (2009) 183–199

**[7]Defining and designing polymers and hydrogels for neural tissue engineering**

Emily R. Auranda, Kyle J. Lampec, Kimberly B. Bjugstada,  
Neuroscience Research 72 (2012) 199–213

**[8]Development of biomaterial scaffold for nerve tissue engineering:  
Biomaterial mediated neural regeneration**

Anuradha Subramanian, Uma Maheswari Krishnan and  
SwaminathanSethuraman

Journal of Biomedical Science 16 ( 2009) 1-11

**[9]Differences between the effect of anisotropic and isotropic laminin and  
nerve growth factor presenting scaffolds on nerve regeneration across  
long peripheral nerve gaps**

Mahesh Chandra Dodla, Ravi V. Bellamkonda

Biomaterials 29 (2008) 33–46

**[10]Electrically Conductive Biodegradable Polymer Composite  
for Nerve Regeneration: Electricity-Stimulated Neurite  
Outgrowth and Axon Regeneration**

Ze Zhang, Mahmoud Rouabhia, Zhaoxu Wang, Christophe Roberge, Guixin Shi,  
Phillippe Roche, Jiangming Li, and Lê H. Dao

Artificial Organs 31(2007) 13–22

**[11]Electrospinning of nano/micro scale poly(L-lactic acid) aligned fibers  
and their potential in neural tissue engineering**

F. Yanga, R. Muruganb, S. Wangc, S. Ramakrishna,

Biomaterials 26 (2005) 2603–2610

**[12]Electrospun micro- and nanofiber tubes for  
functional nervous regeneration in sciatic nerve transections.**

Panseri S, Cunha C, Lowery J, Carro UD, Taraballi F, Amadio S, Vescovi  
A, Gelain F

BMC Biotechnology 8:39 (2008) 1-12

**[13]Fabrication of nano-structured porous PLLAscaffold intended for  
nerve tissue engineering**

F. Yanga, R. Murugana, S. Ramakrishna, X. Wangc, Y.-X. Mac, S. Wang

Biomaterials 25 (2004) 1891–1900

**[14]Freeze-dried agarose scaffolds with uniaxial channels stimulate and  
guide linear axonal growth following spinal cord injury**

Shula Stokolsa, Mark H. Tuszynski

Biomaterials 27 (2006) 443–451

**[15]Local gene delivery from ECM-coated poly(lactide-co-glycolide)  
multiple**

**channel bridges after spinal cord injury**

Laura De Laporte, Anna Lei Yan, Lonnie D. Shea

**[16]Matrix inclusion within synthetic hydrogel guidance channels improves specific supraspinal and local axonal regeneration after complete spinal cord transection**

Eve C. Tsaia, Paul D. Daltonb, Molly S. Shoichetb, Charles H. Tator  
Biomaterials 27 (2006) 519–533

**[17]Method of tissue engineering**

A. Atala, R.P. Lanza (2002)

Cap. 64 Processing of polymer scaffold: Gas foam processing (733-736)  
Thomas P. Richardoson, Maartin C. Peters, David J. Mooney

**[18]Multifunctional, multichannel bridges that deliver neurotrophin encoding**

**lentivirus for regeneration following spinal cord injury**

Hannah M. Tuinstra, Misael O. Aviles, Seungjin Shin, Samantha J. Holland, Marina L. Zelivyanskaya, Alan G. Fast, Sarah Y. Ko, Daniel J. Margul, Anne K. Bartels, Ryan M. Boehler, Brian J. Cummings, Aileen J. Anderson, Lonnie D. Shea  
Biomaterials 33 (2012) 1618-1626

**[19]Multiple-channel scaffolds to promote spinal cord axon regeneration**

Michael J. Moorea, Jonathan A. Friedmanb, Eric B. Lewellync, Sara M. Mantilaa,  
Aaron J. Krychd, Syed Ameenuddinc, Andrew M. Knightc, LichunLua, Bradford L. Currierd, Robert J. Spinnerd,f, Richard W. Marshd, Anthony J. Windebank, Michael J. Yaszemski  
Biomaterials 27 (2006) 419–429

**[20]Neuronal Laminins and Their Cellular Receptors**

Sharon K. Powell, Hynda K. Kleinman  
Cell Biol. (1997) Vol. 29, No. 3. pp. 401 414

**[21]Neuroscienze 3 ed. italiana**

Dale Purves , George J Augustine , David Fitzpatrick , Lawrence C Katz , Anthony-Samuel Lamantia , James O McNamara , S. Mark Williams  
Zanichelli (2009) 530 584-587

**[22]Neurotrophin releasing single and multiple lumen nerve conduits**

Yang Yanga, Laura De Laportea, Christopher B. Rivesa, Jae-HyungJanga, Wei-Chun Linb, Kenneth R. Shullb, Lonnie D. Sheaa  
Journal of Controlled Release 104 (2005) 433–446

**[23] Porous chitosan scaffolds for tissue engineering**

Sundararajan V. Madihally, Howard W.T. Matthew

Biomaterials 20 (1999) 1133-1142

**[24] Regeneration of long-tract axons through sites of spinal cord injury using**

**templated agarose scaffolds**

Thomas Gros, Jeff S. Sakamoto, Armin Blesch, Leif A. Havton, Mark H.

Tuszynski

Biomaterials 31 (2010) 6719-6729

**[25] Relationship between scaffold channel diameter and number of regenerating axons in the transected rat spinal cord**

Aaron J. Krych, Gemma E. Rooney, Bingkun Chen, Thomas C. Schermerhorn, Syed Ameenuddin, LouAnn Gross, Michael J. Moore, Bradford L. Currier, Robert J. Spinner, Jonathan A. Friedman, Michael J. Yaszemski, Anthony J. Windebank

Acta Biomaterialia 5 (2009) 2551–2559

**[26] Restoration of function after spinal cord transection using a collagen bridge**

Satoru Yoshii, Masanori Oka, Mitsuhiro Shima, Ataru Taniguchi, Yoshiro Taki, Masao Akagi

Wiley InterScience (2004) 1-7

**[27] The adult paraplegic rat: treatment with cell graftings**

Eduardo Fernandez, MDT, Stefano Mannino, MD, Tommaso Tufo, MD, Roberto Pallini, MD,

Liverana Lauretti, MD, Alessio Albanese, MD, Luca Denaro, MD

Department of Neurosurgery, Center of Research on Regeneration in the Nervous System, Catholic University School of Medicine, 00168 Rome, Italy

Received 7 February 2005; accepted 15 June 2005

**[28] The effect of substrate stiffness on adult neural stem cell behavior**

Nic D. Leipzig, Molly S. Shoichet

Biomaterials 30 (2009) 6867–6878

**[29] The effect of the alignment of electrospun fibrous scaffolds on Schwann cell maturation**

Sing Yian Chew<sup>a,b</sup>, Ruifa Mic<sup>a</sup>, Ahmet Hokec<sup>d</sup>, Kam W. Leong<sup>e</sup>,

Biomaterials 29 (2008) 653–661

**[30]The fabrication and characterization of linearly oriented nerve guidance scaffolds for spinal cord injury**

Shula Stokolsa, Mark H. Tuszynski  
Biomaterials 25 (2004) 5839–5846

**[31]The progressive nature of Wallerian degeneration in wild-type and slow Wallerian degeneration (WldS) nerves**

Bogdan Beirowski<sup>1,2</sup>, Robert Adalbert<sup>1,4</sup>, Diana Wagner<sup>1</sup>,  
Daniela S Grumme<sup>1</sup>, Klaus Addicks<sup>2</sup>, Richard R Ribchester<sup>3</sup> and  
Michael P Coleman

**[32]The performance of laminin-containing cryogel scaffolds in neural tissue regeneration**

Marcin Jurga , Maria B. Dainiak , Anna Sarnowska, Anna Jablonska,  
Anuj Tripathi, Fatima M. Plieva, Irina N. Savina, Lukasz Strojek , Hans Jungvid ,  
Ashok Kumar, Barbara Lukomska, Krystyna Domanska-Janik, Nico Forraz, Colin  
P. McGuckin  
Biomaterials 32 (2011) 3423e3434

**[33]The promotion of neural regeneration in an extreme rat spinal cord injury model using a collagen scaffold containing a collagen binding neuroprotective protein and an EGFR neutralizing antibody**

Qianqian Han, Wei Jin , Zhifeng Xiao, Hongbin Ni, Jinhuan Wang, Jie Kong,  
Jun Wu , Weibang Liang, Lei Chen, Yannan Zhao, Bing Chen, Jianwu Dai,  
Biomaterials 31 (2010) 9212-9220

**[34]The regeneration of transected sciatic nerves of adult rats using chitosan nerve conduits seeded with bone marrow stromal cell-derived Schwann cells**

Qiang Ao, Chun-Kit Fung, Alex Yat-Ping Tsui, Sa Cai, Huan-Cong Zuo, Ying-Shing Chan, Daisy Kwok-Yan Shum  
Biomaterials 32 (2011) 787-796

## **Bibliografia per capitoli**

### **Capitolo 1:**

[2] [6] [7] [8] [10][18][21][24][33][34]

### **Capitolo 2:**

[4] [5] [7] [8] [9] [10] [12] [14] [16] [18] [24] [25] [26] [28][30][33]



**Capitolo 3:**

[1] [2][6][7] [8] [9][15][18][20] [21][27][29][31][32] [33]

**Capitolo 4:**

[3][6][8][11][13][17][18][19][22][23][25][29][30]