



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA



DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

**“PROGETTAZIONE E REALIZZAZIONE DI GUIDE NEURALI E
FILLER PER LA RIGENERAZIONE DEL TESSUTO NERVOSO”**

Relatrice: Prof.ssa Monica Dettin

Laureanda: Cristina De David

ANNO ACCADEMICO 2022 – 2023

Data di laurea 28/09/2023

Abstract

I nervi periferici possono subire lesioni che portano alla perdita parziale o completa delle funzioni sensoriali e motorie e al dolore neuropatico.

Visti alcuni limiti degli autoinnesti, i ricercatori stanno cercando metodi di trattamento alternativi. I condotti nervosi artificiali offrono un'interessante alternativa nella riparazione dei nervi periferici. Tuttavia, il loro utilizzo è limitato alla riparazione di lacune nervose di lunghezze ridotte. Pertanto, la ricerca attuale si concentra sulla progettazione di condotti artificiali con un migliore potenziale di rigenerazione nervosa su *gap* più estesi.

Introducendo brevemente l'anatomia del sistema nervoso, in particolare quello periferico, la tipologia e le modalità di trattamento delle lesioni nervose, in questo lavoro vengono presentati e messi in luce pro e contro di alcuni dei condotti nervosi attualmente in commercio, materiali, *design*; con una particolare attenzione per i riempitivi lumenali. Inoltre, vengono descritti brevemente alcuni processi di produzione di NGC, in particolare la biostampa 3D, e di ciascun metodo vengono introdotti i principali vantaggi e svantaggi.

Indice

Abstract	3
1. Introduzione: Il sistema nervoso	7
1.1. Struttura del Sistema nervoso	7
1.1.1 Struttura dei nervi periferici	8
1.2 Rigenerazione nervosa	9
1.3 Lesioni del tessuto nervoso periferico	9
1.4 Modalità di intervento per la riparazione dei nervi periferici	10
1.4.1 Neurorrafia	11
1.4.2 Autoinnesti	11
1.4.3 Alloinnesti	11
1.4.4 Innesti di tessuto ingegnerizzato (guide neurali)	12
2. Guide neurali per la rigenerazione del tessuto nervoso	13
2.1 Vantaggi e svantaggi delle neuroguide e possibili miglioramenti	13
2.2 Guide neurali in commercio	14
2.2.1 Dispositivi non riassorbibili (origine sintetica): SaluTunnel®	14
2.2.2 Dispositivi riassorbibili (origine sintetica): Neurotube® e Neurolac®	15
2.2.3 Dispositivi riassorbibili (origine naturale): AxoGuard® e Neuragen®	17
3. Materiali e design per la realizzazione delle neuroguide	19
3.1 Materiali	19
3.1.1 Polimeri naturali	19
3.1.2 Polimeri sintetici	22
3.1.3 Materiali compositi	25
3.2 <i>Design</i>	26
3.2.1 <i>Design</i> cavo/non poroso	26
3.2.2 <i>Design</i> poroso	27
3.2.3 <i>Design</i> scanalato	27
3.2.4 <i>Design</i> multicanale	28
3.2.5 NGC con riempitivi	29
4. Filler luminali	31
4.1 <i>Filler</i> cellulari	31
4.1.1 Cellule di Schwann (SC)	31
4.1.2 Cellule stromali del midollo osseo (o staminali mesenchimali, MSC)	32
4.1.3 Cellule staminali di origine adiposa (ADSC)	33
4.1.4 Cellule di rivestimento olfattivo (OEC)	34
4.2 <i>Filler</i> strutturali	34
4.2.1 Collagene	34

4.2.2	Laminina.....	35
4.2.3	Fibrina.....	36
4.2.4	Matrici sintetiche longitudinali.....	36
4.3	<i>Filler</i> neurotrofici	37
4.3.1	Fattore di crescita nervosa (NGF)	38
4.3.2	Fattore neurotrofico di derivazione cerebrale (BDNF)	38
4.3.3	Fattore neurotrofico derivante dalle cellule gliali (GDNF).....	39
5.	Tecniche di Fabbricazione delle neuroguide.....	41
5.1	<i>Solvent Casting</i>	41
5.2	<i>Dip Coating</i>	41
5.3	<i>Freeze-drying</i>	42
5.4	<i>Electrospinning</i>	42
5.5	<i>3D Bioprinting</i>	43
5.5.1	Stereolitografia	43
5.5.2	<i>Digital Light Processing</i>	44
5.5.4	<i>Laser Assisted Bioprinting</i>	46
5.5.5	<i>Extrusion based Bioprinting</i>	47
	Conclusioni.....	48
	Acronimi.....	49
	Bibliografia.....	50

1. Introduzione: Il sistema nervoso

1.1. Struttura del Sistema nervoso

Il Sistema Nervoso è un sistema altamente specializzato, che consente la comunicazione e la coordinazione di tutto l'organismo per rispondere adeguatamente ai vari cambiamenti ambientali. Esso è organizzato in:

- Sistema Nervoso Centrale (SNC): sistema che comprende encefalo e midollo spinale, responsabile dell'integrazione e dell'elaborazione delle informazioni ricevute dai nervi.
- Sistema Nervoso Periferico (SNP): sistema formato dai nervi spinali ed encefalici e dai gangli ad essi associati.

Il tessuto nervoso è ciò che costituisce il sistema nervoso, esso riceve, elabora e trasmette gli impulsi; la sua unità funzionale è una cellula altamente specializzata: il neurone (figura 1.1); esso presenta la capacità di poter essere eccitato e trasmettere impulsi, ed è formato da:

- un corpo cellulare detto soma: comprendente nucleo, i diversi organelli citoplasmatici e abbondanti ribosomi associati al reticolo endoplasmatico rugoso.
- dendriti: sottili e molto ramificati, possono presentare protuberanze dette gemme.
- un assone: deputato alla trasmissione di impulsi, generalmente più lungo dei dendriti, origina dal soma e si può ramificare ripetutamente; ciascuna ramificazione termina con un rigonfiamento a forma di bottone: la terminazione sinaptica.

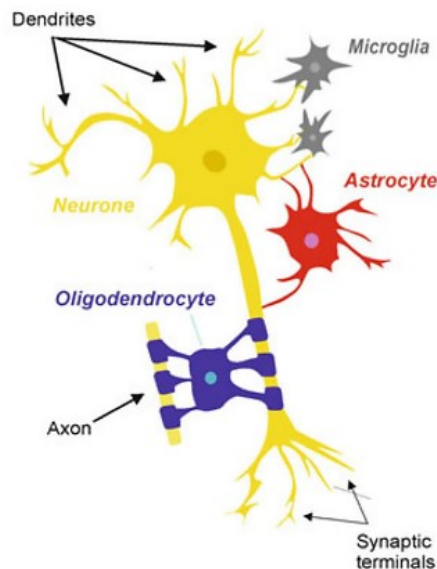


Figura 1.1: illustrazione schematica del neurone e delle cellule della neuroglia del SNC. [53]

I neuroni, in base alle loro funzioni sono classificati in: afferenti, efferenti e interneuroni.

I neuroni afferenti trasportano i segnali dai recettori al SNC, mentre i neuroni efferenti trasportano i segnali dal SNC alle varie parti del SNP, gli interneuroni invece si trovano tra gli afferenti e gli efferenti, per integrarne il funzionamento.

Vi sono altri tipi cellulari che affiancano il neurone, hanno funzione di supporto e cooperazione nelle funzioni neuronali e prendono il nome di cellule della neuroglia: nel SNC sono presenti gli oligodendrociti, gli astrociti, le cellule della microglia, le cellule ependimali; nel SNP vi sono le cellule di Schwann (che formano la guaina mielinica) e le cellule satelliti.

Lungo lo sviluppo delle fibre nervose periferiche si formano dei raggruppamenti di neuroni: i gangli. Essi possono essere suddivisi in:

- gangli sensitivi spinali e dei nervi encefalici;
- gangli del sistema nervoso viscerale (sia ortosimpatico che parasimpatico). [1, 2]

1.1.1 Struttura dei nervi periferici

Sia i nervi cranici che quelli spinali sono costituiti da fasci nervosi, composti da fibre nervose e tessuto connettivo. Il tessuto connettivo ha sia il compito di fornire supporto meccanico alle fibre nervose, a causa delle pressioni e compressioni durante i movimenti del corpo, sia il compito di fornire un supporto nutritivo alle fibre nervose, poiché contiene vasi sanguigni.

I nervi sono quindi costituiti da tre strati (figura 1.2), dal più esterno al più interno:

1. Epinevrio: strato denso di tessuto connettivo che circonda molteplici fasci e microvasi (arteriosi, venosi e linfatici).
2. Perinevrio: circonda fasci di nervi in modo da formare un'unità che funge da barriera protettiva per gli assoni.
3. Endonevrio: circonda i singoli nervi e le cellule di Schwann. [2, 3]

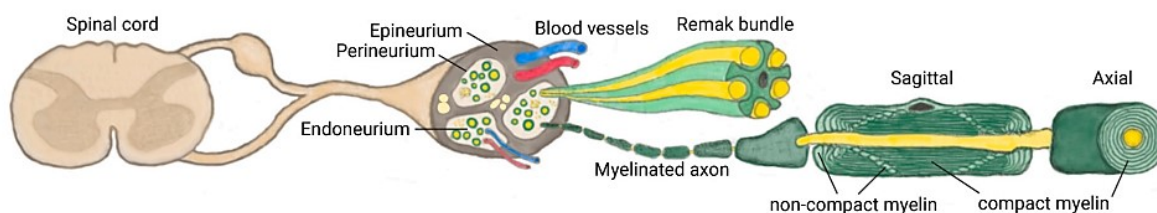


Figura 1.2: illustrazione schematica della struttura dei nervi periferici. [52]

1.2 Rigenerazione nervosa

I danni al sistema nervoso possono essere causati da fattori ischemici, chimici, meccanici o termici; essi possono portare a perdita parziale o completa delle funzioni sensoriali, motorie, dell'autonomia e al dolore neuropatico. Queste lesioni coinvolgono sia SNC che SNP, ma vi è differenza di risposta tra i due.

Rigenerazione nel SNC

Nel SNC gli assoni non si rigenerano spontaneamente: sono presenti, infatti, dei fattori che inibiscono la ricrescita degli assoni, come gli inibitori associati alla mielina (MAIs) e i proteoglicani di condroitina solfato (CSPGs).

Per questo motivo, i metodi di trattamento si basano sulla soppressione di questi fattori inibitori, ciò però rende le opzioni di terapia limitate. [2]

Rigenerazione nel SNP

Il SNP ha la capacità di rigenerazione assonale, essa inizia all'estremità prossimale di un nervo danneggiato, dopo la rimozione della mielina e dei residui assonali da parte delle cellule di supporto (degenerazione walleriana). In primo luogo, si forma un cavo di fibrina tra i due segmenti entro la prima settimana di riparazione; le cellule di Schwann iniziano a proliferare e a de-differenziarsi in un fenotipo rigenerativo, assumendo una morfologia allungata e allineandosi in colonne (bande di Büngner) lungo il cavo di fibrina esistente; queste bande regolari forniscono indicazioni fisiche per il nervo in via di rigenerazione grazie all'aumento delle molecole di adesione e grazie alla produzione di fattori chemiotattici neurotrofici necessari per la sopravvivenza e la crescita del nervo. Il processo termina quando i nuovi assoni appena cresciuti raggiungono l'estremità distale del nervo reciso, dopodiché avviene l'ultima fase del recupero, cioè la mielinizzazione, che si osserva a circa quattro settimane dal recupero.

Per raggiungere il pieno recupero, il nervo dunque deve subire tre processi: degenerazione walleriana, rigenerazione assonale e reinnervazione dell'organo terminale; il fallimento di una di queste fasi può contribuire a un recupero funzionale compromesso. [3]

1.3 Lesioni del tessuto nervoso periferico

Le lesioni del SNP (PNI) sono classificate secondo Seddon in tre categorie (figura 1.3), basate sulla gravità della lesione tissutale, sulla prognosi e sul tempo di recupero:

1. Neuroaprassia: si tratta di una lesione comunemente indotta da demielinizzazione focale e/o ischemia, di solito una conseguenza di compressione o stiramento. Sebbene l'assone sia intatto, la conduzione degli impulsi nervosi è bloccata nell'area lesa, perdendo così

le connessioni motorie e sensoriali, tuttavia il blocco di conduzione si recupera in poche ore, giorni, settimane o fino a qualche mese.

2. Axonotmesi: l'assone e la sua guaina mielinica vengono interrotti, ma il tessuto connettivo circostante rimane parzialmente o completamente intatto. È comunemente riscontrabile nelle lesioni da schiacciamento, stiramento o percussione; la degenerazione walleriana avviene distalmente entro 24-36 ore dal verificarsi della lesione.
3. Neurotmesi: il tratto nervoso è stato interrotto e i tessuti connettivi sono distrutti. È causata dalla recisione del nervo o da neurotossine, ed è il grado più grave di lesione del nervo periferico.

Poiché nella neuroaprassia non è necessaria alcuna rigenerazione nervosa, il blocco di funzione è transitorio e consente una ripresa completa e in genere rapida; le possibilità di ripresa invece diminuiscono per il IV (axonotmesi con rottura di perinervio ed endonevrio) e V (neurotmesi) grado di Sunderland, lesioni in cui è necessario intervenire chirurgicamente. [4 - 6]

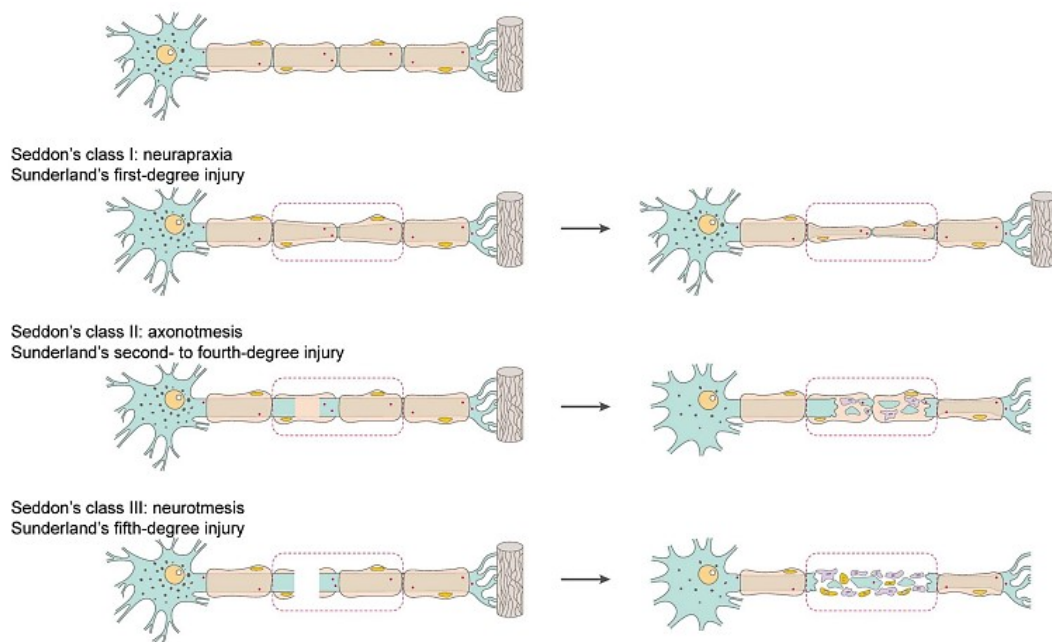


Figura 1.3: Rappresentazione schematica della classificazione delle lesioni dei nervi periferici. [5]

1.4 Modalità di intervento per la riparazione dei nervi periferici

Alcuni fattori influenzano il recupero funzionale nervoso, come: lunghezza della lacuna nervosa, tempo trascorso tra la lesione e il trattamento e età del paziente.

I metodi di trattamento delle PNI possono essere di tipo non chirurgico o chirurgico. I metodi non chirurgici prevedono: stimolazione elettrica, stimolazione magnetica, fototerapia laser e

introduzione di fattori di crescita. I metodi chirurgici comprendono la neurorrafia e gli innesti; questi ultimi si suddividono in: autoinnesti, alloinnesti e innesti di tessuto ingegnerizzato.

1.4.1 Neurorrafia

Per le PNIs a lacuna nervosa breve (<1 cm), la neurorrafia è una procedura chirurgica comune; essa consiste nella sutura chirurgica di due estremità di un nervo interrotto.

Per le PNIs più estese (>2 cm), la neurorrafia comporterebbe una tensione eccessiva sulla zona di sutura, con conseguente compromissione del risultato chirurgico. Per questo motivo l'innesto nervoso è il metodo di trattamento più comunemente usato per le PNIs con *gap* nervoso medio e grande. [2]

1.4.2 Autoinnesti

Gli autoinnesti consistono nella rimozione chirurgica e nel trapianto di tessuto proveniente dal paziente stesso nel sito della lesione; il tessuto usato per l'innesto è il sostitutivo ideale, in quanto presenta caratteristiche chimiche, biologiche e strutturali simili a quelle del tessuto originario, e non è soggetto alla reazione avversa del corpo rispetto ad un corpo estraneo.

Di norma, per trattare una PNI, si impiegano segmenti del nervo surale; sono però stati osservati una migliore rigenerazione e un miglior recupero funzionale quando si utilizza un tipo di nervo simile a quello su cui si va ad intervenire.

Sebbene l'autoinnesto sia considerato il *gold standard* del trattamento della PNI, il tasso di successo della guarigione dopo l'intervento di autotrapianto è solo del 50%. Gli autoinnesti, infatti, possono presentare problemi di collasso, attorcigliamento, morbilità del sito di donazione, disadattamento del tubo endoneurale e fascicolare e mancanza di fattori neurotrofici; inoltre, il nervo utilizzato per riparare un nervo motorio lesso è di solito un nervo sensitivo funzionante, ciò comporta una perdita di sensibilità, una seconda incisione per prelevare il tessuto dell'innesto, cicatrici nel sito donatore e formazione di neuromi. [3, 7]

1.4.3 Alloinnesti

Gli alloinnesti sono innesti di tessuto prelevati da cadaveri; essi presentano diversi vantaggi: hanno una disponibilità illimitata rispetto agli autoinnesti, corrispondono alle dimensioni e alla specificità del tipo di neurone (motorio/sensoriale) del ricevente, contengono le microstrutture endoneurali necessarie per facilitare la rigenerazione dei nervi e sono una fonte potenziale di cellule di Schwann funzionanti.

Gli allotrapianti hanno dimostrato un recupero paragonabile a quello degli autoinnesti nervosi, tuttavia, presentano principalmente uno svantaggio: la prescrizione di immunosoppressori, ciò

predispone i pazienti ad effetti collaterali; eventualmente è possibile ricorrere alla decellularizzazione, tecnica che consente di rimuovere i componenti cellulari; purtroppo, però, a causa della rimozione delle cellule di Schwann, il suo utilizzo è stato finora limitato a lacune di lunghezza ridotta.

Tuttavia, a differenza del trapianto di organi, l'allograpianto di nervi richiede solo un'immunosoppressione temporanea. Una volta che si è verificata un'adeguata migrazione di cellule di Schwann dell'ospite nel nervo trapiantato, a circa 24 mesi, l'immunosoppressione sistemica può essere ritirata. [3, 7]

1.4.4 Innesti di tessuto ingegnerizzato (guide neurali)

Le strutture tubolari ingegnerizzate a livello tissutale, realizzate con biopolimeri naturali e/o sintetici e progettate per fornire gli strumenti meccanici e biochimici necessari per il processo di rigenerazione neurale, sono chiamate guide neurali (NGC) (figura 1.4); esse sono un'alternativa all'innesto di tessuto e potrebbero superare le limitazioni poste dai metodi di innesto e sutura dei nervi.

Le NGC fungono da collegamento tra le terminazioni nervose lesionate, favoriscono la diffusione di fattori di crescita e di chemioattrattori, che aiutano a dirigere la rigenerazione del nervo, attraverso gradienti di diffusione, verso il segmento distale e impediscono l'infiltrazione di tessuto cicatriziale fibroso durante il recupero.

Le caratteristiche di una neuroguida ideale includono: caratteristiche strutturali volte ad allineare longitudinalmente gli assoni in rigenerazione, una permeabilità sufficiente a fornire un supporto trofico, proprietà meccaniche compatibili con il tessuto incapsulato, un'architettura biomimetica e la produzione di un materiale biodegradabile e biocompatibile che consenta l'integrazione del tessuto dopo la completa rigenerazione. [2, 3]

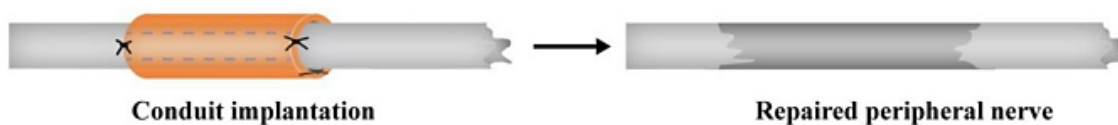


Figura 1.4: Illustrazione schematica di innesto di NGC. [16]

2. Guide neurali per la rigenerazione del tessuto nervoso

2.1 Vantaggi e svantaggi delle neuroguide e possibili miglioramenti

L'attuale trattamento di riferimento per la PNI, se non è possibile riparare il nervo primario senza tensione, è l'autotrapianto di nervi; tuttavia, l'uso dell'autotrapianto è stato ostacolato dalle limitate fonti di nervi donatori, dall'aumento dei tempi operativi, dalla morbidità e dalla perdita funzionale del sito donatore. Per questo motivo, da circa 20 anni le guide neurali (o neuroguide o neurotubuli) sono state sperimentate nella pratica clinica e proposte come alternativa all'innesto.

L'utilizzo di NGC possiede il significativo vantaggio di evitare il sacrificio di un altro nervo dal sito donatore e la morbidità ad esso associata. Vi sono però alcune limitazioni nell'applicazione clinica delle NGC attualmente disponibili in commercio:

- la struttura tubulare rende difficile l'impianto poiché non è sempre possibile avere un preciso accoppiamento tra i diametri della guida e quelli del nervo;
- sono richiesti dei punti di sutura per essere tenute in sede; ciò rende possibile una reazione sfavorevole fibroblastica;
- all'aumentare della lunghezza e/o del diametro della guida impiegata si riduce la percentuale di successo nella rigenerazione nervosa; in parte dovuta alla difficoltà delle SC di migrare su lunghe distanze.

La revisione dei risultati clinici presenti in letteratura ha mostrato come nelle PNI, soprattutto dei nervi sensitivi e con perdite di sostanza non superiori ai 20-30 mm, le guide siano comparabili agli innesti; difatti attualmente il loro uso è limitato ai nervi periferici di piccolo diametro e alle lesioni di piccole dimensioni.

Da uno studio condotto sui chirurghi che si occupano di riparazione dei nervi periferici condotta da K. Brattain, [8] si è stabilito che, come interventi primari dei trattamenti disponibili, gli NGC sono stati utilizzati il 27,7% delle volte per *gap* inferiori a 8,9 mm, il 21,1% delle volte tra 8,9 mm e 20 mm, ma non sono stati utilizzati come interventi primari oltre i 20 mm.

Nonostante ciò, sono stati ottenuti risultati promettenti sperimentando delle varietà di riempitivi luminali per colmare lo spazio tra le estremità nervose recise. Questi riempitivi saranno costituiti da componenti della matrice extracellulare con o senza cellule di supporto e/o fattori neurotrofici per promuovere la crescita assonale e fornire una struttura di supporto luminale per gli assoni in fase di gemmazione. [3, 9, 10]

2.2 Guide neurali in commercio

Attualmente esistono diversi potenziali progetti per la produzione di NGC, ma solo alcuni hanno ricevuto l'autorizzazione della FDA (Tabella 2.1).

Tabella 2.1: condotti di guida nervosa disponibili in commercio con relative proprietà. [47]

Product Name	Company	Material	Structure and Properties	Available Dimensions (inner diameter x length)
Avance Nerve Graft®	Axogen Corporation	Decellularized and processed nerve allograft from human peripheral nerve	<ul style="list-style-type: none"> Risk of transmission of infectious disease 	Varied dimensions: (1 - 5) mm x (15 - 70) mm
Axoguard Nerve Connector®	Axogen Corporation	Small intestine submucosa (SIS)	<ul style="list-style-type: none"> Semi-transparent coaptation aid Easy to handle, pliable, nonfriable, and porous Unsuitable for patients sensitive to porcine materials 	For nerve gaps up to 5 mm - (1.5 - 7) mm x (10 - 15) mm
Axoguard Nerve Protector®	Axogen Corporation	SIS	<ul style="list-style-type: none"> Rolled-up sheet Semi-translucent Easy to handle, pliable, nonfriable, and porous Unsuitable for patients sensitive to porcine materials 	For nerve gaps up to 40 mm - (2 - 10) mm x (20 - 40) mm
NeuraGen®	Integra LifeSciences Co.	Collagen Type I	<ul style="list-style-type: none"> Double-layered conduit - Semi-permeable, smooth inner membrane and porous outer layer Flexible and pliable Compression resistant Absorption via normal metabolic pathways Resorption period: 6-17 months [51] Degradation period: 3-4 years 	Varied dimensions: (1.5 - 7) mm x (2 - 3) cm
NeuraWrap™	Integra LifeSciences Co.	Collagen Type I	<ul style="list-style-type: none"> Semipermeable Rolled-up sheet with a longitudinal slit Degradation period: 3 - 4 years 	Varied dimensions: (3-10) mm x (2-4) cm
NeuroFlex™	Collagen Matrix, Inc.	Collagen Type I	<ul style="list-style-type: none"> Semipermeable tubular collagen matrix Corrugated side walls Flexible and kink-resistant - can bend up to 60 degrees Absorption via normal metabolic pathways Degradation period: within 3 - 6 months 	Varied dimensions: 2-6 mm x 2.5 cm
NeuroMend™	Collagen Matrix, Inc.	Collagen Type I	<ul style="list-style-type: none"> Rolled semipermeable collagen membrane Degradation period: within 3 - 6 months 	Varied dimensions: (2-5) mm x (4-12) mm; Suitable for injured nerves with diameters from 1 to 9 mm
NeuroMatrix™	Collagen Matrix, Inc.	Collagen Type I	<ul style="list-style-type: none"> Semipermeable tubular collagen conduit with non-corrugated side walls Degradation period: within 3-6 months 	Varied dimensions: 2-6 mm x 2.5 cm
Neurotube®	Synovis® Micro Companies Alliance Inc.	Polyglycolic acid (PGA)	<ul style="list-style-type: none"> Absorbable woven PGA Mesh Tube Resorption via hydrolysis Degradation period: 3 months 	2.3 mm x 40 mm for nerve gap from ≥ 8 mm to ≤ 30 mm; 4.0 mm x 20 mm for nerve gap from ≥ 8 mm to ≤ 10 mm
Neurolac® and Neurolac® TW	Polyganics B.V.	Poly (D, L-lactide-co- ϵ -caprolactone)	<ul style="list-style-type: none"> Synthetic and transparent conduit Non-immunogenic, flexible Controlled mechanical support - up to 10 weeks Degraded byproducts are less acidic compared to PGA conduits Degradation period: 16 months 	Suitable for nerve gaps up to 20 mm Neurolac® TW: (1.5-3) mm x 3 cm Neurolac®: (4-10) mm x 3 cm
SaluTunnel™	SaluMedica L.L.C.	Polyvinyl alcohol	<ul style="list-style-type: none"> Flexible tubular sheath with a longitudinal slit Non-biodegradable 	(2, 5, 10 mm) x 6.35 cm
SaluBridge™	SaluMedica L.L.C.	Polyvinyl alcohol	<ul style="list-style-type: none"> Tubular conduit Non-biodegradable 	(2 - 10 mm) x 6.35 cm

2.2.1 Dispositivi non riassorbibili (origine sintetica): SaluTunnel®

SaluTunnel® è composto da idrogel di alcool polivinilico, un biomateriale idrofilo e non degradabile (chiamato Salubria®). È indicato per la gestione delle lesioni dei nervi periferici in cui non vi è stata una perdita sostanziale di tessuto nervoso.

Vantaggi principali:

- la composizione dell'idrogel Salubria® contiene acqua in proporzioni simili a quelle del tessuto umano, rendendolo morbido e conforme;

- struttura meccanicamente stabile e facilmente sterilizzabile.

Limitazioni principali:

- la natura non riassorbibile di questo materiale si presta a problemi di compressione del nervo e di tensione sulle linee di sutura dopo la rigenerazione del nervo;
- non esistono studi clinici pubblicati che abbiano esaminato l'efficacia di questo materiale in modo controllato, randomizzato e prospettico. [11]

2.2.2 Dispositivi riassorbibili (origine sintetica): Neurotube® e Neurolac®

Neurotube® (figura 2.1) è un tubo a rete riassorbibile in acido poliglicolico (PGA), progettato per la riparazione o la ricostruzione primaria o secondaria dei nervi periferici; è destinato al singolo uso in pazienti con una lesione a un nervo periferico, in cui il *gap* è superiore o uguale a 8 mm, ma inferiore o uguale a 30 mm. Possiede pareti corrugate per garantire resistenza e flessibilità; ciò impedisce al tubo di collassare sotto le normali pressioni fisiologiche dei tessuti molli. Si riassorbe attraverso il processo di idrolisi.

Vantaggi principali:

- ha un'eccellente degradabilità, buone proprietà meccaniche iniziali, ed è associato ad alti livelli di vitalità cellulare;
- In studi clinici randomizzati, è stato riportato che il dispositivo ha un'efficacia paragonabile al *gold standard* in lesioni fino a 20 mm;
- ha il maggior numero di dati clinici a disposizione dei chirurghi per l'esame della sua sicurezza ed efficacia rispetto a tutti i dispositivi approvati dalla FDA.

Limitazioni principali:

- elevato tasso di degradazione;
- contigua riduzione delle proprietà meccaniche a breve termine;
- prodotti di degradazione acidi;
- bassa solubilità. [11, 12]



Figura 2.1: Neurotube®. [12]

La guida nervosa **Neurolac®** (figura 2.2), prodotta in poli-DL lattato- ϵ -caprolattone (poliestere semicristallino idrofobo), è completamente sintetica, biologicamente inerte e di comprovata sicurezza clinica. Si riassorbe completamente entro 16 mesi, senza necessità di rimozione; fornisce guida e protezione agli assoni in rigenerazione e previene la crescita di tessuto fibroso nella lacuna nervosa.

È caratterizzata da un'elevata trasparenza, così da consentire il posizionamento ottimale delle terminazioni nervose e l'individuazione di coaguli di sangue.

È indicata per *gap* nervosi periferici fino a 20 mm in pazienti con interruzione completa di un nervo periferico.

Vantaggi principali:

- in studi clinici randomizzati è stato riportato che il dispositivo ha un'efficacia paragonabile al *gold standard* in difetti fino a 20 mm;
- ha la più ampia serie di dati preclinici disponibili in letteratura rispetto a tutti i dispositivi approvati dalla FDA.

Limitazioni principali:

- la sua elevata rigidità è limitante e può essere utilizzato solo dopo l'immersione in una soluzione salina;
- Meek MF. e Coert JH. hanno inoltre notato la frequente rottura dell'ago per suturare, una volta applicato il dispositivo in posizione, a causa della rigidità delle NGC. Di conseguenza, ulteriori complicazioni derivano dall'uso di un ago più grande per l'applicazione della sutura, con maggiori danni e reazioni avverse più probabili.
- l'inflessibilità di Neurolac® può anche portare allo strappo dei monconi nervosi dal lume delle NGC durante il periodo di rigenerazione, a causa dell'inflessibilità sulle articolazioni durante l'immobilizzazione. [11, 13]

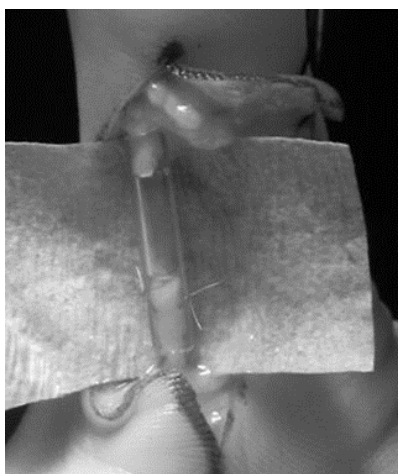


Figura 2.2: difetto del nervo ulnare collaterale ricostruito con il condotto nervoso Neurolac®. [61]

2.2.3 Dispositivi riassorbibili (origine naturale): AxoGuard® e Neuragen®

Axoguard® Nerve Connector (figura 2.3) è l'unica neuroguida costituita da matrice extracellulare (ECM) di sottomucosa suina per la riparazione senza tensione di nervi periferici tranciati o lesionati. La semitrasparenza di questa guida neurale consente di avvicinarsi ai nervi recisi, favorendo l'allineamento e la connessione delle estremità nervose recise con uno spazio inferiore a 5 mm. Il materiale di cui è costituita consente il processo di guarigione naturale dell'organismo, isolando e proteggendo il nervo durante il processo di guarigione. Le cellule del paziente si incorporano nella ECM per rimodellare e formare un tessuto simile all'epinevrio del nervo. [14]

Vantaggi principali:

- sembra sopravvivere in un ospite xenogenico senza evidenti conseguenze immunologiche negative;
- offre un buon supporto biomeccanico;
- il microambiente che si forma con questo materiale sembra avere un impatto positivo sul rimodellamento dei tessuti;
- induce una risposta corporea per resistere alle infezioni.

Limitazioni principali:

- costo elevato;
- proprietà fisico-chimiche e di degradazione variabili;
- rischio di trasmissione di malattie infettive a causa dell'origine xenogenica del materiale;
- in letteratura mancano dati preclinici e clinici disponibili per questo dispositivo, che consentano ai chirurghi di valutare adeguatamente l'efficacia del materiale. [11]



Figura 2.3: AxoGuard® Nerve connector. [55]

NeuraGen® (figura 2.4) è stato il primo condotto di guida nervoso semipermeabile in collagene di tipo I a ricevere l'approvazione della FDA nel 2001.

Vantaggi principali:

- il collagene di tipo I è abbondante, facilmente isolato e purificato e può essere prodotto in modo da offrire vari gradi di riassorbibilità;
- l'adesività per diversi tipi di cellule consente la sopravvivenza e la proliferazione a lungo termine;
- il collagene di tipo I ha una consolidata biocompatibilità e ha dimostrato di sostenere e guidare la rigenerazione dei tessuti *in vivo*;
- in studi clinici prospettici e retrospettivi, è stato riportato che ha un'efficacia paragonabile al *gold standard* in lesioni fino a 20 mm.

Alcuni studi preclinici dimostrano l'efficacia in difetti fino a 40 mm; nessun altro dispositivo della FDA ha riportato in letteratura livelli di efficacia fino a questa lunghezza di lacuna.

Limitazioni principali:

- il tempo necessario per la completa biodegradazione completa (48 mesi) può portare alla compressione dei nervi;
 - risposte immunitarie indesiderate e la necessità di usare farmaci immunosoppressivi.
- [11, 15]

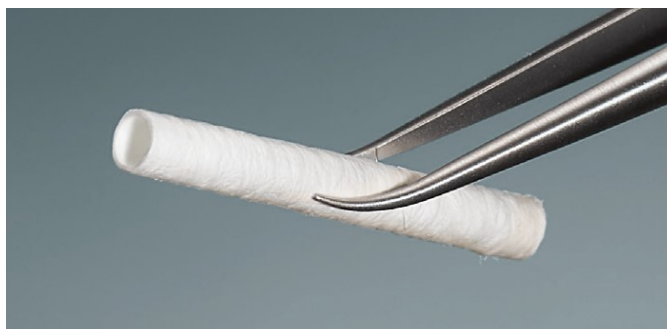


Figura 2.4: NeuraGen® Nerve Guide. [54]

3. Materiali e *design* per la realizzazione delle neuroguide

3.1 Materiali

Sono stati applicati diversi materiali per la realizzazione di NGC che imitano il microambiente naturale dei nervi periferici, per guidare la crescita e l'estensione neurale.

I materiali polimerici per la realizzazione degli *scaffold* sono particolarmente importanti nell'ingegneria tissutale; essi includono principalmente polimeri naturali e sintetici. Le NGC realizzati con polimeri naturali hanno solitamente un'eccellente biocompatibilità e possono promuovere l'adesione e la crescita delle cellule. I polimeri sintetici, invece, hanno buone proprietà meccaniche per la fabbricazione di *scaffold* tridimensionali.

Un materiale adatto per la realizzazione di *scaffold* dovrebbe favorire la crescita cellulare, la rigenerazione assonale, indurre la differenziazione specifica delle cellule e il riequilibrio del microambiente. Pertanto, biocompatibilità, proprietà meccaniche e biodegradabilità sono indicatori primari per giudicare la qualità dei materiali per *scaffold*. [16]

3.1.1 Polimeri naturali

I polimeri naturali trovano ampia applicazione nell'ingegneria tissutale grazie alla loro superiore biodegradabilità e biocompatibilità, forniscono un ambiente biomimetico e favorevole alle cellule. Tuttavia, a causa delle loro deboli proprietà meccaniche e della difficoltà nel fabbricarli in strutture 3D, per la realizzazione di NGC vengono utilizzati principalmente polimeri sintetici. I principali biopolimeri per la ricostruzione dei nervi periferici sono: i componenti della ECM e i loro derivati, le proteine naturali come collagene, gelatina, trombina e fibrinogeno e i polisaccaridi come cellulosa, chitina e chitosano.

Collagene (Col)

Il collagene è una proteina strutturale dei tessuti connettivi nell'uomo e negli animali ed è il componente principale della matrice extracellulare. È un materiale naturale biodegradabile con elevata biocompatibilità e bassa antigenicità, noto per promuovere la crescita e la rigenerazione dei nervi e per contribuire al mantenimento delle funzioni biologiche cellulari.

La struttura tridimensionale del collagene naturale comprende cinque strutture gerarchiche: struttura primaria (polimero a blocchi costituiti da una tripletta di amminoacidi), struttura secondaria (elica 3,3 sinistrorsa), struttura terziaria (tripla elica), struttura quaternaria (fibrille) e struttura di aggregazione supermolecolare.

La molecola di collagene di tipo I (figura 3.1) ha 3 catene α e circa 1014 amminoacidi per ogni catena. Gli amminoacidi sono ripetuti in modo permutativo lungo l'intera catena, seguiti dalla

sequenza tripeptidica $-(\text{Gly-X-Y})_n-$. Gly è l'abbreviazione di glicina, che costituisce circa il 30% del contenuto totale degli aminoacidi nel collagene. X o Y rappresentano uno degli aminoacidi, esclusa la glicina. Anche se, un'alta percentuale di residui (~20%) nelle sequenze tripeptidiche, è spesso costituita da prolina (X) e idrossiprolina (Y).

L'idrossiprolina si trova solo nella proteina collagene e il suo contenuto totale è superiore al 50% rispetto agli altri aminoacidi presenti. La prolina e la lisina possono formare l'idrossiprolina e l'idrossilisina per idrossilazione dell'idrossilasi; i due aminoacidi partecipano al legame a ponte idrogeno, alle forze di van der Waals e al legame covalente tra le catene polipeptidiche. La formazione di forze molecolari svolge un ruolo importante nel mantenimento della struttura a tripla elica della molecola di collagene e nel comportamento di autoaggregazione extracellulare.

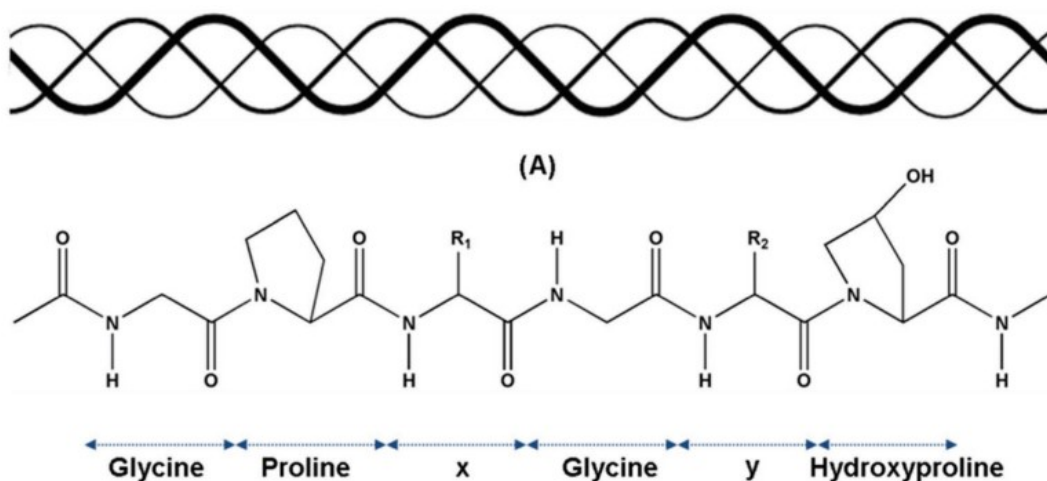


Figura 3.1: Struttura chimica del collagene di tipo I. [18]

Il collagene presenta una scarsa resistenza meccanica, un elevato assorbimento di acqua e una rapida degradazione, caratteristiche indesiderabili nella rigenerazione nervosa. Infatti, il suo rigonfiamento può comprimere il nuovo tessuto nervoso in fase di crescita. Per ovviare a questi svantaggi, sono state adottate alcune tecniche, come la *Solution casting* e la *Freeze-drying*, per ottenere la resistenza meccanica e la porosità richieste.

Inoltre, la resistenza meccanica può essere migliorata mediante reticolazione del collagene con gruppi amminici, la quale fornisce stabilità strutturale al condotto. [17, 18]

Fibroina della seta (SF)

La fibroina della seta, componente proteico della seta, è un candidato eccellente per l'applicazione di *scaffold* (3D), fibre, *film*, spugne porose, idrogeli e condotti nervosi (figura 3.2) grazie alla sua elevata biocompatibilità, alla lenta degradazione, alla non tossicità, alla non

immunogenicità e alle proprietà meccaniche superiori rispetto ad altri polimeri naturali. Inoltre, è stato dimostrato che la fibroina stimola l'adesione e la crescita delle cellule umane.

Per poter essere utilizzata, la SF, deve subire un processo di dissoluzione e a seconda dei diversi solventi utilizzati, si osservano diverse morfologie di fibroina rigenerata. Avendo però una struttura strettamente impacchettata, è insolubile nella maggior parte dei solventi utilizzati per la dissoluzione dei polimeri per le applicazioni biotecnologiche. Pertanto, ottenere una soluzione di SF richiede l'uso di bromuri o tiocianati quasi saturi e la dialisi, dopo la quale la soluzione è instabile e difficile da conservare a lungo. [16, 19, 20]

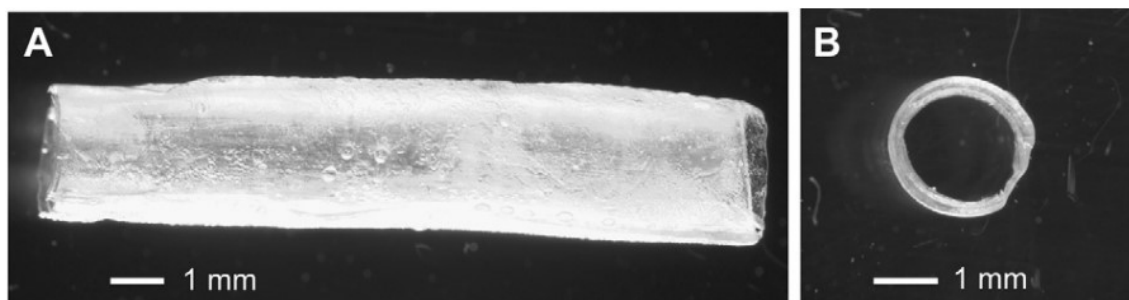


Figura 3.2: vista laterale(A) e trasversale(B) di un condotto nervoso di SF nanostrutturato. [65]

Chitosano (CS)

Il chitosano (figura 3.3) è un biopolimero cationico ottenuto dalla deacetilazione alcalina della chitina, che è il polimero naturale più abbondante dopo la cellulosa.

È composto da gruppi ripetuti di glucosammina e N-acetil glucosammina legati da un legame β -1,4 glicosidico ben presente in natura.

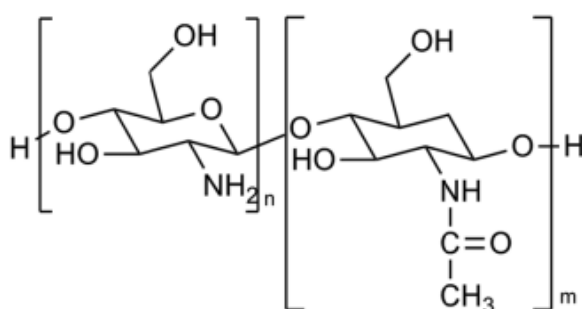


Figura 3.3: struttura del chitosano [18]

Il chitosano è popolare nell'ingegneria biologica per le sue straordinarie proprietà, tra cui:

- biodegradabilità: si degrada in sostanze normalmente presenti nell'organismo grazie alla presenza di gruppi che si legano alle cellule dei mammiferi e dei batteri [21];
- tossicità trascurabile;
- biocompatibilità: le proprietà superficiali del chitosano consentono interazioni favorevoli con le cellule, facilitando la loro adesione e proliferazione. Grazie alla sua

struttura porosa esso facilita il trasporto di nutrienti e ossigeno, favorendo la crescita cellulare e la formazione di nuovi vasi sanguigni. Inoltre, la struttura molecolare del chitosano fornisce siti di legame per i recettori cellulari, promuovendo la loro interazione e innescando le risposte cellulari specifiche necessarie per la rigenerazione dei tessuti;

- non immunogenicità: garantisce reazioni avverse o risposte immunitarie minime quando viene impiantato nell'organismo. Inoltre, possiede la capacità di inibire la formazione di tessuto cicatriziale;
- proprietà antibatteriche: inibisce la crescita batterica e distrugge la struttura della loro parete cellulare. Può formare pellicole o rivestimenti stabili con proprietà antibatteriche di lunga durata;
- basso costo e grande disponibilità.

Purtroppo, presenta una bassa resistenza meccanica in condizioni fisiologiche, esso è fragile nella sua forma disidratata e deve essere miscelato con un materiale secondario o reticolato chimicamente prima di essere trasformato in neuroguida. Oltre alla resistenza meccanica, anche la porosità è una proprietà che deve essere ottimizzata per ottenere un valore adeguato. [18, 22, 23]

3.1.2 Polimeri sintetici

I polimeri sintetici possono essere classificati come non degradabili o degradabili.

A causa dei problemi causati dai polimeri non degradabili, tra cui la possibile infiammazione e la chirurgia secondaria; quelli degradabili sono recentemente i più utilizzati. Essi, infatti, offrono buone proprietà meccaniche e hanno la capacità di degradarsi completamente *in vivo*; pertanto alla fine della rigenerazione, il condotto dovrebbe essere completamente scomparso in modo da evitare la risposta immunitaria dell'organismo.

I polimeri sintetici degradabili più utilizzati sono il policaprolattone (PCL), l'acido polilattico (PLA), l'acido poliglicolico (PGA) e l'acido poli(lattico-co-glicolico) (PLGA). [15, 18]

Policaprolattone

Il PCL (figura 3.4) è uno dei polimeri sintetici più comunemente utilizzati per la fabbricazione di NGC. È un poliesteri semi-cristallino, idrofobo e biorassorbibile, possiede eccezionali proprietà meccaniche, facile lavorabilità e compatibilità con le miscele. Tuttavia, la scarsa biodegradabilità è uno dei principali difetti.

Diversi studi hanno utilizzato il PCL per la fabbricazione di NGC, dove la sua capacità di essere lavorato in impalcature fibrose allineate, ha fornito spunti topografici per l'allineamento direzionale degli assoni e ha portato a una migliore rigenerazione dei nervi periferici sia in studi *in vitro* che *in vivo*. [2, 16, 18]

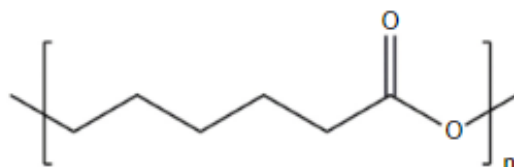


Figura 3.4: struttura del policaprolattone. [66]

Acido poliglicolico

Il PGA (figura 3.5) è un poliesteri alifatico noto in campo biomedico come materiale di sutura per la chiusura delle ferite. È stato utilizzato per molto tempo in questa applicazione, poiché può essere assorbito dal corpo umano entro 90 giorni dall'impianto, attraverso un meccanismo di idrolisi.

Il PGA è stato utilizzato per la prima volta come condotto di guida nervosa nel 1990, da Mackinnon e Dellon [24], e i risultati sono stati simili a quelli ottenuti con l'autotrapianto di nervi. Sebbene diversi lavori riportino buoni risultati, altri riferiscono che esso presenta alcune problematiche:

- ha un tasso di degradazione troppo rapido, cosa che può essere svantaggiosa per le lacune nervose più estese;
- tecnica utilizzata per fabbricare il condotto: quando è stata utilizzata la tecnica dell'estrusione, la superficie dei condotti in PGA ha presentato una qualità scadente;
- i prodotti che vengono rilasciati durante la degradazione hanno una natura acida, di conseguenza portano a una diminuzione del pH nel sito di impianto che può scatenare la risposta immunitaria.

Dati questi limiti, si è iniziato ad utilizzare il PGA non come materiale del condotto nervoso, ma come riempitivo. [18, 23]

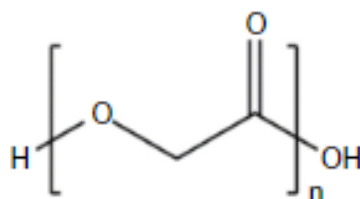


Figura 3.5: struttura dell'acido poliglicolico. [66]

Acido poli(lattico-co-glicolico)

Il PLGA (figura 3.6) è un copoliestere alifatico ottenuto da acido glicolico e acido lattico, approvato dalla FDA e utilizzato da anni come materiale di sutura.

Nella produzione di neuroguide, il PLGA è stato testato come materiale centrale del condotto e anche in combinazione con altri (ad esempio, il collagene). Quando viene utilizzato da solo, per renderlo permeabile e con una porosità adeguata, sono stati sperimentati alcuni approcci, ovvero l'aggiunta di un agente porogeno e la preparazione di membrane a fibra cava utilizzando un processo di inversione di fase.

Rapporti diversi tra i due monomeri del PLGA consentono di personalizzare le proprietà del polimero (ad esempio, termomeccaniche, di rigonfiamento e di degradazione), il che rappresenta un vantaggio rispetto al PGA. Infatti, la capacità di manipolare il rapporto di degradazione consente di adattare il materiale a diversi tipi e dimensioni di lacune nervose. Tuttavia, esso rilascia prodotti acidi durante la degradazione, il che scatena una risposta immunitaria; pertanto, in generale, non rappresenta una buona alternativa per la rigenerazione dei nervi periferici. [18]

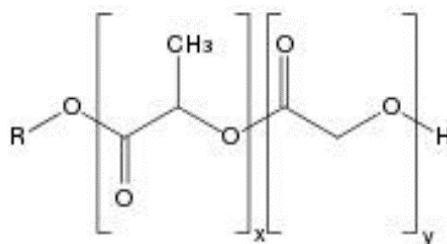


Figura 3.6: struttura del PLGA. [64]

Poli-DL lattato-ε-caprolattone

Il P(DLLA-co-CL) (figura 3.7) è un poliestere composto da acido D, L-lattico e ε-caprolattone. I problemi derivanti dalla sua degradazione *in vivo* comportano un minor danno al tessuto circostante rispetto al PGA o al PLGA, poiché i suoi prodotti di degradazione sono meno acidi. Rispetto agli altri materiali biodegradabili, è più idrofobico, il che può portare a tempi di degradazione più elevati, allungando la vita del condotto all'interno dell'organismo; questo fa sì che, in alcuni casi, anche dopo la rigenerazione del nervo e il ripristino dell'attività funzionale, siano ancora presenti piccoli frammenti dei condotti nervosi accanto al nuovo nervo. [18]

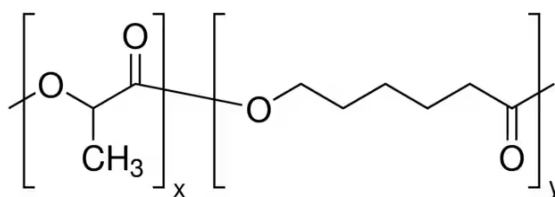


Figura 3.7: struttura del Poli-DL lattato-ε-caprolattone. [56]

3.1.3 Materiali compositi

Esistono quattro tipi di materiali compositi per condotti nervosi:

- 1) Il primo tipo è costituito da materiali naturali, tra cui Col/CS, CS/SF e Col/SF. Essi combinano la funzione di guida per l'orientamento della rigenerazione della fibroina, la capacità di adesione cellulare del Collagene e le prestazioni di degradazione adeguate del chitosano. Tuttavia, questi NGC presentano alcuni svantaggi, come le scarse proprietà meccaniche e la difficoltà di preparazione del condotto.
- 2) Il secondo tipo è costituito da materiali sintetici, tra cui PCL/polipirrolo(PPy), polietilenglicole/acido poli(L-lattico)(PLLA), poli(D,L-lattide-co-etilenglicole)/PPy e PCL/PPy.

I vantaggi delle neuroguide prodotte con questi materiali sono: processo di preparazione fisso, possibile produzione di massa e proprietà meccaniche eccellenti. Tuttavia, le applicazioni di questi condotti sono limitate anche dalla biocompatibilità relativamente scarsa di alcuni componenti.

- 3) Il terzo tipo, oggi il più utilizzato, è costituito da materiali naturali e sintetici, tra cui CS/poli(3-idrossibutirrato-co-3-idrossivalerato) (PHBV), polietilenimina (PEI)/Alg, Alg/CS/PLA, SF/poli-L-lattide-co-caprolattone(PLCL), PGA/Col, PLCL/SF/PPy. Questi compositi combinano i vantaggi dei materiali naturali e di quelli sintetici, consentono di preparare NGC con proprietà meccaniche specifiche, comportamenti di degradazione regolabili ed eccellente biocompatibilità. Tuttavia, il principale svantaggio di questo tipo di condotto è che la purificazione dei polimeri naturali è difficile e la variabilità tra i campioni è difficile da controllare.
- 4) Il quarto tipo è costituito da compositi organico-inorganico. Il vantaggio di questi materiali è quello di utilizzare le proprietà delle sostanze inorganiche, come l'elevata conducibilità elettrica del grafene e dell'ossido di grafene ridotto. Mentre, il loro svantaggio è la necessità di verificare la sicurezza a lungo termine degli inorganici incorporati. [25]

3.2 Design

Gli assoni in rigenerazione sviluppano espansioni della punta distale, chiamate coni di crescita, che esplorano e riconoscono le indicazioni di crescita e di guida nell'ambiente circostante. I coni di crescita estendono protrusioni membranose chiamate filopodi e lamellipodi che interagiscono con l'ambiente extracellulare su scala nanometrica. L'adesione del cono di crescita e l'attaccamento a una superficie solida sono necessari per la crescita dell'assone; pertanto, la microarchitettura dell'interno della neuroguida è probabilmente un fattore cruciale per ottenere una crescita efficace degli assoni attraverso un *gap* nervoso.

I *design* delle NGC possono essere classificati in cinque gruppi principali: *design* cavo/non poroso, *design* poroso, *design* scanalato, *design* multicanale e NGC con riempitivi.

3.2.1 Design cavo/non poroso

Il *design* cavo o non poroso è il più semplice di tutti i *design* e consiste in un tubo cavo fatto di polimeri naturali o sintetici. Esso presenta molti limiti rispetto ai vantaggi che possiede.

Vantaggi:

- relativamente semplice da fabbricare.

Limiti:

- la superficie non porosa non consente il trasporto di nutrienti e fattori di crescita;
- manca di messaggi biologici, biochimici e biofisici che sono essenziali per la crescita direzionale dei nervi;
- può portare alla compressione del nervo a causa dell'accumulo di liquido extracellulare.

Per superare gli svantaggi di questo *design* semplice, sono state apportate diverse modifiche per renderlo poroso. [2, 26]

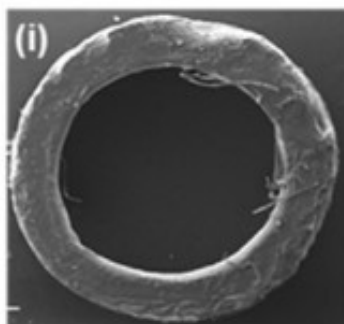


Figura 3.8: immagini al SEM in sezione trasversale della guida cava a base di PCL. [47]

3.2.2 *Design poroso*

Negli ultimi decenni, gli NGC porosi (figura 3.9) sono stati valutati per il loro potenziale di supporto alla rigenerazione dei nervi periferici. Una corretta selezione del grado di porosità del condotto è importante per promuovere una rigenerazione nervosa ottimale.

Vantaggi:

- consentono ai vasi sanguigni, ai nutrienti, all'ossigeno e ai fattori di crescita di permeare la struttura;
- consentono la migrazione di cellule di Schwann dal tessuto nervoso adiacente, con conseguente formazione di strutture allineate simili alle bande di Büngner.

Limiti:

- assenza di indicazioni topografiche per l'allineamento direzionale;
- il controllo delle dimensioni dei pori durante la fabbricazione è difficile. [2, 26]

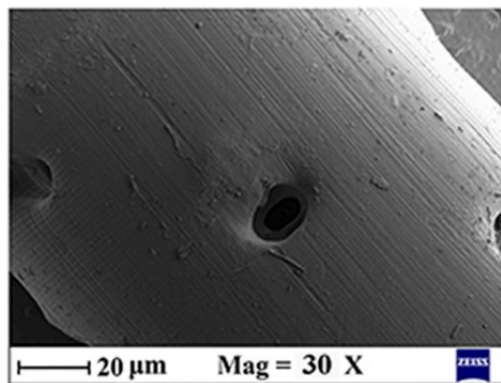


Figura 3.9: immagine in sezione trasversale al SEM di un condotto poroso. [59]

3.2.3 *Design scanalato*

Gli NGC con *design* scanalato presentano scanalature sulla superficie interna della struttura tubolare (figura 3.10).

Vantaggi:

- le microscanalature facilitano l'allineamento direzionale degli assoni in fase di rigenerazione.

Limiti:

- geometria complicata;
- difficoltà di fabbricazione.

Rutkowski et al. hanno studiato un *design* di questo tipo con un lume interno micro-disegnato. Tuttavia, non è stata riscontrata alcuna differenza significativa tra i *design* scanalati e non scanalati. [2]

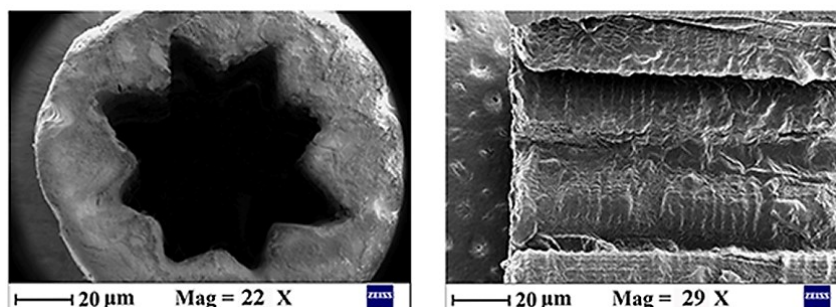


Figura 3.10: immagini in sezione trasversale e longitudinale al SEM del condotto stampato in 3D con scanalature. [59]

3.2.4 Design multicanale

Il *design* multicanale presenta canali intraluminali (figura 3.11) utilizzati per simulare la struttura anatomica dei fasci nervosi.

Vantaggi:

- facilita l'adesione delle cellule di Schwann;
- favorisce il rilascio di fattori di crescita;
- riduce la dispersione degli assoni in fase di rigenerazione.

Limiti:

- lumi di dimensioni macro non possono fornire spunti fisici sufficienti per la crescita direzionale degli assoni;
- la presenza dei multicanali riduce la permeabilità e la flessibilità meccanica.

In vivo, le neuroguide di collagene-chitosano con microcanali paralleli orientati longitudinalmente, hanno mostrato una rigenerazione nervosa e un recupero funzionale simile agli autoinnesti. [26, 27]

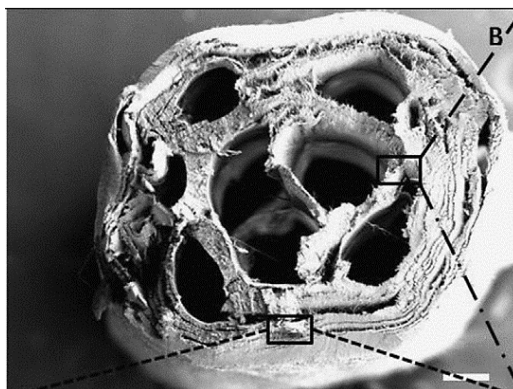


Figura 3.11: immagini al SEM di un NGC multicanale. [67]

3.2.5 NGC con riempitivi

Nel caso di una lacuna nervosa >20 mm, un condotto cavo non è in grado di promuovere una buona rigenerazione del nervo. Di conseguenza, è stata approfondita l'idea di incorporare riempitivi luminali nei condotti neurali (figura 3.12), nel tentativo di migliorare l'efficacia dei condotti a distanze più brevi, e di estendere la distanza operativa dei condotti nella ricostruzione dei nervi per una più ampia applicazione clinica.

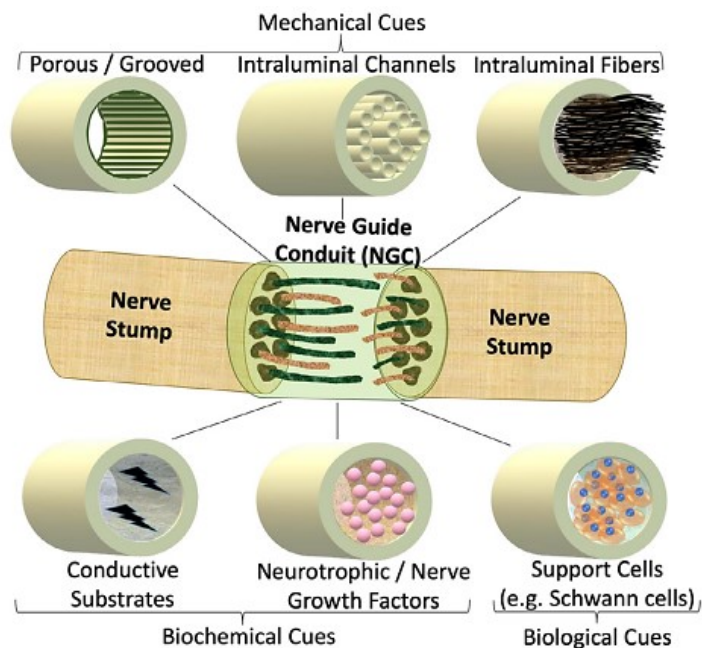


Figura 3.12: condotti di guida nervosa con spunti meccanici, biochimici e biologici. [2]

I *filler* fungono da impalcature del lume, imitano la struttura della ECM, promuovono la migrazione dei macrofagi nella fase iniziale e la fagocitosi, promuovono la migrazione delle SC, la formazione di bande di Büngner e favoriscono la ricrescita degli assoni lungo l'asse.

I riempitivi possono essere ampiamente classificati in segnali biochimici e segnali fisici. In termini di segnalazione biochimica, sono spesso coinvolti fattori di crescita/neurotrofici, cellule, acidi nucleici e molecole ECM come il collagene, la laminina e la fibronectina. In termini di messaggi fisici questi spesso coinvolgono filamenti e fibre (figura 3.12).

In diversi studi sono stati utilizzati polisaccaridi, molecole ECM, proteine e peptidi per preparare una matrice idrogel da utilizzare in NGC cavi. Inoltre, per imitare l'innesto nervoso autologo, sono stati condotti studi che incorporano microfilamenti all'interno delle neuroguide.

Vantaggi:

- le fibre di riempimento facilitano l'allineamento direzionale dei neuroni;
- la superficie esterna può essere resa porosa;
- gli idrogel offrono un ambiente favorevole alle cellule;
- i messaggi biochimici possono essere incorporati negli idrogel;

Limiti:

- procedura di fabbricazione a due fasi per il tubo esterno e il riempimento interno;
- con i riempitivi a idrogel non vi è nessuna indicazione topografica per l'allineamento direzionale. [2, 26, 28]

4. *Filler* luminali

In seguito alla PNI, le terminazioni nervose danneggiate secernono un fluido contenente varie cellule, componenti strutturali e fattori neurotrofici (NTFs) importanti per la rigenerazione del nervo. A partire da tali osservazioni riguardanti la risposta alla lesione, i ricercatori hanno sperimentato l'introduzione di sostanze simili come riempitivi luminali nei condotti nervosi.

I *filler* possono essere di tre tipologie: cellulari, strutturali e neurotrofici.

4.1 *Filler* cellulari

Il trapianto di cellule e la loro incorporazione nei condotti nervosi è una strategia alternativa alla somministrazione di NTF; le cellule trapiantate infatti, possono essere adattate per secernere un mix di fattori per la creazione di un microambiente favorevole alla rigenerazione nervosa.

Alcuni riempitivi cellulari possono essere: cellule di Schwann, cellule stromali del midollo osseo, cellule di rivestimento olfattivo (OEC) e cellule staminali di origine adiposa (ADSC).

4.1.1 Cellule di Schwann (SC)

Le cellule di Schwann svolgono un ruolo indispensabile nel sostenere la ricrescita e la migrazione assonale in seguito alle lesioni dell'SNP. Nella regione lesa, esse rilasciano NTF che, insieme all'adenosina trifosfato (ATP) e alla neuregulina rilasciata dal moncone prossimale, innescano la formazione di nuove SC e, insieme all'acetilcolina, stimolano la loro ulteriore proliferazione.

L'introduzione delle SC nelle neuroguide può essere ottenuta con diversi metodi: iniezione diretta di una sospensione cellulare nel lume, sospensione all'interno di un idrogel intraluminale, distribuzione lungo strutture di guida intraluminali o rilascio tramite il canale luminale. [29]

Aspetti che influiscono sulla rigenerazione nervosa:

- **Adeguate supporto strutturale:** per garantire la sopravvivenza delle cellule di Schwann nel sito della lesione sono comunemente utilizzati gli idrogel (alginato/fibronectina, gelatina, collagene e Matrigel sono tra le scelte più comuni); mentre un metodo alternativo consiste nel migliorare la topografia della superficie interna dei condotti per aumentare l'area superficiale disponibile per l'adesione e la crescita delle cellule.
- **Origine cellulare:** utilizzando un tubo in copolimero acrilonitrile vinilcloruro (PAN/PVC) riempito con cellule di Schwann singeniche o eterologhe sospese in Matrigel, Guenard et al. (1992) [30], hanno colmato una lacuna di 8 mm nel nervo sciatico di ratto. La presenza

di SC singeniche ha favorito un'estesa rigenerazione assonale e ha portato alla formazione di un maggior numero di assoni mielinizzati rispetto ai condotti vuoti o riempiti con il solo Matrigel. Al contrario, le SC eterologhe hanno suscitato forti reazioni immunitarie e hanno determinato solo una crescita limitata di assoni mielinizzati.

- Densità di semina cellulare: Rutkowski e Heath [31] hanno osservato che, sebbene una maggiore densità di SC abbia migliorato la rigenerazione nervosa, una maggiore ramificazione degli assoni può richiedere risorse aggiuntive per mantenere una rigenerazione orientata e, se l'ambiente non è ottimale, si possono formare neuromi dolorosi.
- Microambiente che circonda il sito della lesione: Stang et al. (2005) [32] hanno analizzato gli effetti del diametro del tubo sulla rigenerazione nervosa, utilizzando guide nervose in collagene con diametri interni di 2,5 e 1,5 mm, per colmare una lacuna del nervo sciatico di 20 mm nel modello di ratto. Otto settimane dopo l'impianto, le NGC con un diametro di 1,5 mm hanno ottenuto risultati migliori.

Purtroppo, l'uso clinico delle SC pone diverse difficoltà, la più grande delle quali è la fonte di cellule autologhe. Infatti, per ottenere un numero sufficiente di cellule vitali, sono spesso necessarie dalle 3 alle 10 settimane di espansione e purificazione *ex vivo*. Queste procedure aumentano i costi e il rischio di contaminazione, e soprattutto comportano un ritardo tra lesione e rigenerazione. Ciò spesso porta alla morte delle cellule neuronali nel ganglio della radice dorsale con una conseguente riduzione del potenziale di recupero. A causa di queste problematiche, l'attenzione si è spostata sull'uso di cellule staminali indifferenziate, le quali possono differenziarsi in diversi tipi cellulari in presenza di specifici farmaci/fattori di crescita. [28, 33, 34]

4.1.2 Cellule stromali del midollo osseo (o staminali mesenchimali, MSC)

Le cellule staminali hanno proprietà ideali: si differenziano in più linee cellulari, sono facilmente estraibili, proliferano rapidamente in coltura, sono mantenibili a basso costo e non sollevano problemi etici.

Le MSC sono cellule staminali multipotenti derivate dal midollo osseo in grado di differenziarsi in cellule neurali, comprese cellule simili alle cellule di Schwann (figura 4.1). All'interno delle neuroguide, esse, favoriscono la capacità di *homing* delle cellule e secernono NTF.

Data la facilità nell'ottenere MSC tramite aspirazioni di midollo osseo e la loro espansione in coltura, esse rappresentano una potenziale alternativa alle SC. Infatti, nello studio condotto nel 2017 da Zhang et al. [35], BMSC di ratto sono state geneticamente modificate e successivamente seminate in allotrapianti nervosi acellulari per colmare difetti del nervo sciatico di ratto di 10 mm. Otto settimane dopo l'intervento, le analisi hanno dimostrato una

migliore crescita degli assoni e risultati superiori per quanto riguarda la densità delle fibre mielinizzate, il diametro degli assoni e lo spessore delle guaine mieliniche.

Aspetti che influiscono sulla rigenerazione nervosa:

- Differenziazione cellulare: condotti nervosi caricati con MSC differenziate, rispetto a MSC indifferenziate, possono migliorare significativamente la rigenerazione nervosa. Mimura et al. (2004) [36] hanno utilizzato MSC differenziate sospese in Matrigel e le hanno trasferite su fibre per colmare una lacuna del nervo sciatico di ratto di 10 mm. Dopo 6 mesi, è stato osservato un miglioramento significativo della velocità di conduzione del nervo motore e dell'indice funzionale sciatico nel gruppo trapiantato con MSC differenziate rispetto alle guide nervose di controllo caricate con MSC indifferenziate.
- Derivazione degli innesti: combinando le MSC con allotrapianti di derivazione muscolare o nervosa, si può ottenere un grado di rigenerazione nervosa simile a quello degli autoinnesti seminati con SC. [28, 29, 34]

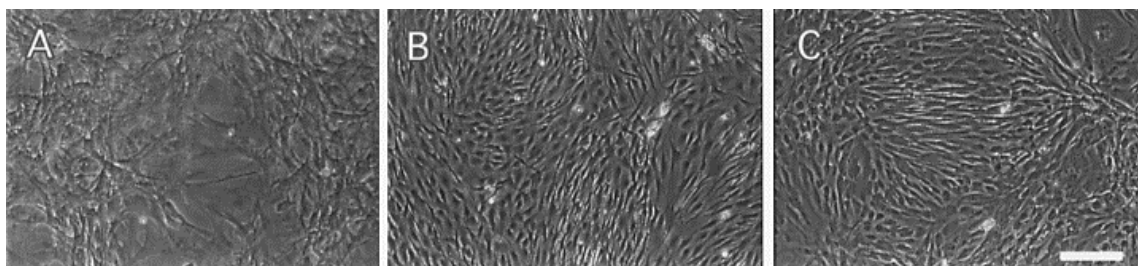


Figura 4.1: microscopia a contrasto di fase di MSC indifferenziate (A) e differenziate (B) e cellule di Schwann (C). [58]

4.1.3 Cellule staminali di origine adiposa (ADSC)

Le ADSC isolate dal tessuto adiposo sono tra le cellule staminali più utilizzate. Esse inibiscono l'apoptosi neuronale, si possono differenziare in SC, hanno un basso profilo immunologico e un'ampia gamma di fonti.

Molti studi *in vitro* e *in vivo* hanno confermato la capacità delle ADSC di promuovere la rigenerazione nervosa, sia in condizioni indifferenziate che differenziate. Tuttavia, le ADSC da sole presentano problemi associati alla ridotta dispersione cellulare e alla bassa efficienza di somministrazione; pertanto, nel 2018, De Luca et al. [37] hanno utilizzato un gel di fibrina ibrido caricato con LN come *scaffold* di trasporto per formare un sistema ibrido ADSC-gel che ha promosso l'estensione dei neuriti dei gangli della radice dorsale (DRG) *in vitro*.

Per quanto riguarda ADSC indifferenziate, la preoccupazione principale è legata alla possibile differenziazione che le cellule possono subire una volta impiantate, dando origine a fenotipi indesiderati, come gli adipociti. La rigenerazione nervosa, infatti, può essere ritardata a causa dell'adipe che ostruisce le NGC. Per quanto riguarda le ADSC differenziate in SC, è stata

accertata la loro capacità di produrre una serie di NTF intrinseci, in particolare il fattore di crescita nervoso (NGF), il fattore neurotrofico cerebrale (BDNF), il fattore neurotrofico derivato dalle cellule gliali (GDNF) e la neurotrofina-4 (NT-4). [25, 29]

4.1.4 Cellule di rivestimento olfattivo (OEC)

Le OEC possono essere considerate cellule progenitrici dei nervi periferici, poiché si sviluppano da un'origine periferica: il placode olfattivo. Hanno capacità simili alle cellule di Schwann, possono ridurre la formazione di cicatrici e promuovere la rigenerazione nervosa producendo fattori neurotrofici come NGF, neurotrofina-3 (NT-3), NT-4/5, BDNF e GDNF; ma, a differenza delle cellule di Schwann, non sono in grado di produrre citochine che attraggono i macrofagi. Essendo una componente sia del SNC che del SNP, gli studi sull'uso delle OEC si sono concentrate principalmente sul SNC; esse sono infatti in grado di auto-rinnovarsi e differenziarsi per promuovere la ricrescita assonale e la rimielinizzazione nei due sistemi nervosi, in condizioni sperimentali (figura 4.2). Vi sono però molte difficoltà quando vengono applicate al contesto clinico, poiché la fonte di OEC autologhe è limitata. [28, 29]

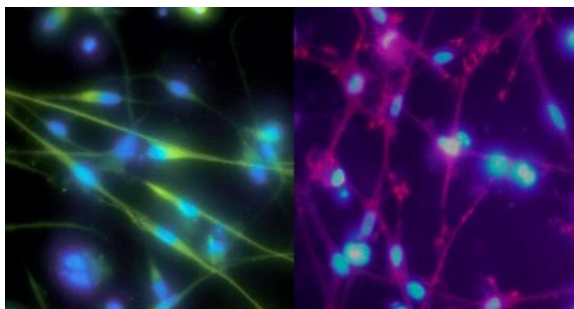


Figura 4.2: OEC che mostrano un fenotipo simile a quello delle cellule di Schwann (a sinistra) e proprietà simili agli astrociti (a destra). [63]

4.2 Filler strutturali

In seguito alla PNI, alle estremità del nervo danneggiato, si accumula del fluido dal quale si sviluppa una matrice costituita principalmente da polimeri di fibrina su cui si aggregano i componenti cellulari. L'inclusione di molecole della ECM nella progettazione di NGC è stata adottata nel tentativo di imitare il microambiente post lesione.

I *filler* strutturali possono essere: collagene, laminina, fibrina e matrici sintetiche longitudinali.

4.2.1 Collagene

Nel 1990, Rosen et al. [38] hanno mostrato il potenziale del collagene utilizzandolo come matrice extracellulare in un condotto di PGA per riparare un *gap* nervoso di ratto di 5 mm. La rigenerazione assonale del dispositivo, in base alla quantità di assoni e dai metodi fisiologici e

funzionali, è stata pari a quella degli autoinnesti, sebbene questi ultimi presentassero diametri assonali superiori.

L'efficacia dell'inclusione di riempitivi del lume di collagene, però, è stata messa in dubbio da uno studio condotto nel 2005 da Stang et al. [39]; è emerso infatti che lo scheletro di collagene luminale formasse una rete irregolare piuttosto che una struttura orientata longitudinalmente; ciò è apparso un ostacolo alla rigenerazione nervosa che nemmeno la presenza di cellule di Schwann poteva superare.

Nel 2014 la FDA ha autorizzato il primo condotto di guida nervosa comprendente un riempimento luminale 3D denominato NeuraGen 3D Nerve Guide Matrix® (figura 4.3). Il condotto stesso è costituito da collagene I e il riempitivo luminale comprende una miscela di collagene I e glicosaminoglicano condroitin-6-solfato. I vantaggi di questa tecnologia sono stati dimostrati *in vivo*, dove è stato riscontrato un visibile miglioramento della rigenerazione nervosa rispetto all'omologa neuroguida cava (NeuraGen®). [28, 29]

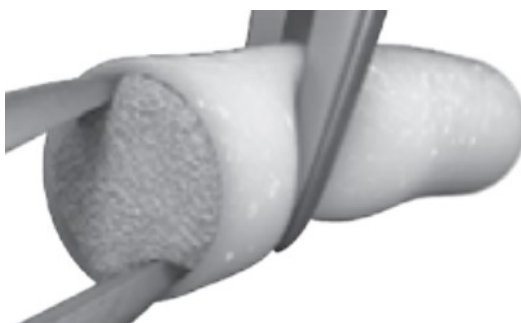


Figura 4.3: NeuraGen 3D Nerve Guide Matrix®. [57]

4.2.2 Laminina

La laminina (LN) è una proteina eterotrimerica che regola la vitalità e la funzione delle cellule e svolge un ruolo critico nella mielinizzazione dei nervi periferici.

In vitro, la laminina mostra un forte effetto dose-dipendente sulla lunghezza e sulla crescita neurale, promuove l'adesione delle SCs e ha una maggiore capacità di favorire la proliferazione delle SCs rispetto al Col I e alla fibronectina.

Nel 2003, Yu e Bellamkonda [40] hanno utilizzato un tubo semipermeabile in polisulfone riempito di LN e NGF per colmare una lacuna di 10 mm del nervo sciatico in ratti adulti. Due mesi dopo l'impianto, le NGC caricate con LN e NGF hanno migliorato la rigenerazione del nervo e hanno ottenuto risultati comparabili a quelli degli autoinnesti in termini di recupero funzionale. È stato inoltre osservato un effetto sinergico tra LN e NGF che ha portato ad un maggior numero di assoni mielinizzati e un più alto tasso di successo della rigenerazione. [25, 28]

4.2.3 Fibrina

La fibrina è una proteina fibrillare che, quando si forma in matrici, agisce come supporto strutturale per la crescita e la rigenerazione dei tessuti biologici, compreso il tessuto neurale.

Nel 2017, Du et al. [41] hanno sviluppato un idrogel di fibrina 3D (figura 4.4) che, grazie alla capacità di imitare il cavo di fibrina nativo all'interno della guida neurale, si è rivelato un microambiente adatto alla rigenerazione nervosa. In questo studio, l'idrogel di fibrina sviluppato con una topografia gerarchicamente allineata ha presentato una bassa elasticità, caratteristica simile alla ECM del nervo e al cavo di fibrina nativo. Dopo uno studio *in vivo* su un modello di difetto di 10 mm nel ratto, è stato osservato che l'idrogel forniva un ambiente positivo per la formazione di cavi di SC e accelerava la rigenerazione assonale con un miglior recupero funzionale motorio. [29]

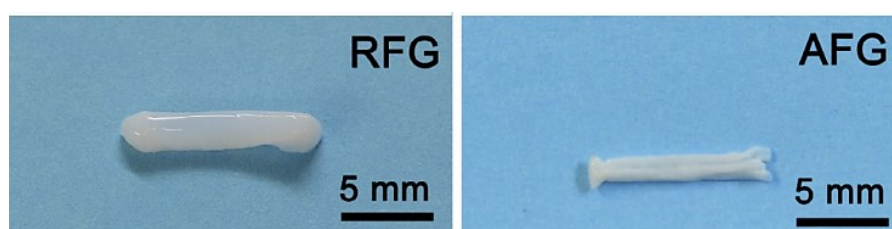


Figura 4.4: a sinistra: idrogel di nanofibre di fibrina random; a destra: idrogel di nanofibre di fibrina allineate. [41]

4.2.4 Matrici sintetiche longitudinali

Le alternative alle reti biologiche sono i filamenti sintetici (figura 4.5), essi offrono il vantaggio di poter essere fabbricati secondo le dimensioni e le caratteristiche desiderate, e di poter essere regolati più accuratamente.

I micro o nano-filamenti allineati unidirezionalmente all'interno delle NGC supportano i coni di crescita assonali nell'identificazione e nella risposta fisiologica all'ambiente circostante stimolandoli a seguire il percorso verso il moncone distale. Inoltre, tali strutture possono consentire l'aumento del rapporto superficie/volume disponibile, migliorando potenzialmente l'adesione e la proliferazione cellulare.

Fattori rilevanti:

1. densità ottimale di filamenti inclusi nel lume: un maggior numero di microfilamenti è associato a una migliore rigenerazione del nervo. Tuttavia, un eccesso di microfilamenti inibisce la crescita assonale;
2. dimensione dei filamenti: l'uso di fibre su scala nanometrica ha dimostrato di fornire i risultati migliori, rendendo l'elettrofilatura una tecnica preferenziale.

Nel 2013, Quigley et al. [42] hanno sviluppato un condotto in cui sono presenti fibre di PLGA allineate nel lume di una guaina di PLA lavorata a maglia e rivestita di nanofibre di PLA elettrofilate. Per fornire un ulteriore supporto, le fibre di PLGA poggiano su un idrogel di alginato impregnato di diversi NTF. Inoltre, sono state scelte con precisione le formulazioni delle fibre per favorire la crescita degli assoni o delle cellule di Schwann. In conclusione, è stato osservato che: le fibre di PLGA allineate sono state notevolmente utili per guidare gli assoni in crescita, erano presenti assoni in germinazione all'interno e intorno al condotto e la maggior parte delle fibre rigenerate erano mielinizzate. [26, 28, 29]

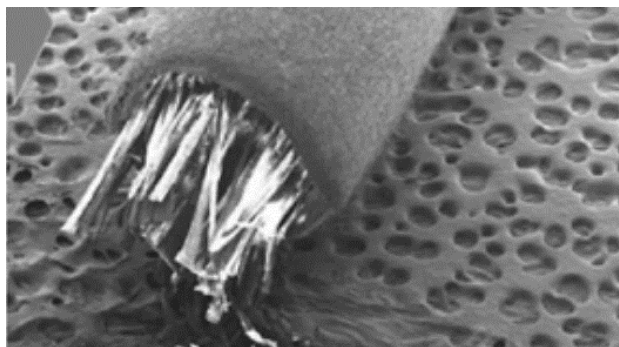


Figura 4.5: SEM di un innesto nervoso nanofibroso. [62]

4.3 Filler neurotrofici

I fattori di crescita (GF) nervosi sono molecole che vengono rilasciate naturalmente durante i processi post lesione, essi sono fondamentali per la crescita, la differenziazione e l'espansione dei nervi. Purtroppo, la somministrazione artificiale di GF è di difficile realizzazione a causa dei loro effetti pleiotropici, della breve emivita biologica e dell'elevata attività biologica, la quale ne obbliga una somministrazione in dosi ridotte.

Il fallimento dell'utilizzo di GF può essere attribuito a una cinetica di rilascio inadeguata, pertanto, si stanno studiando sistemi di rilascio che consentano di regolare quest'ultima. La reticolazione fisica, l'immobilizzazione chimica, il rivestimento polimerico e le nanoparticelle sono alcune delle strategie utilizzate.

Gli NTF normalmente utilizzati per migliorare la rigenerazione nervosa appartengono principalmente a tre gruppi distinti: le neurotrofine, i ligandi della famiglia dei fattori neurotrofici derivati dalle cellule gliali e le citochine neuropoietiche. Il primo gruppo comprende: NGF, BDNF, NT-3 e NT-4. Il secondo gruppo comprende: GDNF e fattore neurotrofico ciliare (CNTF). [29]

4.3.1 Fattore di crescita nervosa (NGF)

L'NGF è ampiamente utilizzato sia *in vivo* che *in vitro*. La sua azione è limitata a poche popolazioni di cellule neuronali; in particolare promuove la crescita dei neuroni sensoriali periferici simpatici e derivati dalla cresta neurale (poiché da solo non è in grado di attraversare la barriera emato-encefalica).

Gli effetti dell'NGF possono essere pro-infiammatori o anti-infiammatori: esso attiva le risposte immunitarie e innesca processi essenziali per inibire la risposta infiammatoria, inoltre attiva i canali del sodio, che sono però correlati al mantenimento di stati di dolore infiammatorio.

Negli ultimi anni sono stati esplorati numerosi esempi di immobilizzazione/reticolazione di fattori di crescita sulle pareti delle NGC e l'incorporazione dell'NGF è stata al centro di molti di questi studi. Per confrontare i diversi metodi di incorporazione di NGF, un gruppo di ricerca [43] ha fissato NGF (insieme allo stabilizzatore BSA) alle pareti delle neuroguide utilizzando:

- 1) come soluzione posta direttamente nel lume;
- 2) come soluzione aggiunta a una miscela di polimerizzazione utilizzata per rivestire il lume;
- 3) co-incapsulato in microsfele di PLGA e sospeso nella miscela di polimerizzazione che è stata poi utilizzata per rivestire il lume (figura 4.6).

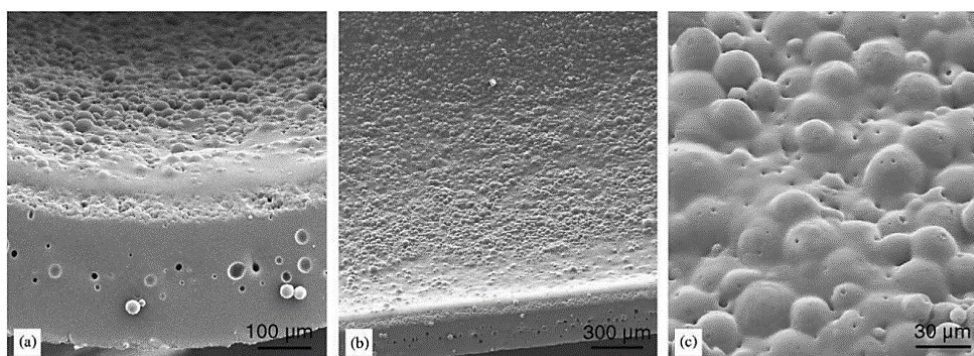


Figura 4.6: micrografie elettroniche a scansione delle superfici interne del lume di canali rivestiti con microsfele di PLGA caricate con NGF/BSA. [43]

Sebbene l'NGF sia stato rilasciato con successo in modo continuo per 30 giorni negli ultimi due casi, questi approcci presentano lo svantaggio di rendere il condotto non biodegradabile. Tuttavia, l'utilizzo di microsfele consente un maggiore controllo sulla cinetica di rilascio e una maggiore versatilità nella modalità di somministrazione. [25, 29, 44]

4.3.2 Fattore neurotrofico di derivazione cerebrale (BDNF)

Il BDNF è coinvolto nei processi di apprendimento e memoria, nella neurogenesi dell'ippocampo, ed è anche implicato nella rigenerazione nervosa a seguito di una lesione. Nei nervi periferici, esso è sintetizzato dalle cellule di Schwann, dai motoneuroni e da uno specifico

sottogruppo di neuroni dei DRG. Di fatto, in queste tre tipologie di cellule, a seguito della lesione nervosa, l'mRNA del BDNF presenta un incremento, mentre i livelli di questo fattore di crescita tornano alla normalità dopo il recupero funzionale.

Gli effetti del BDNF sono limitati ai neuriti dei DRG e all'induzione della crescita di essi. Il BDNF, però, esercita il suo effetto anche attraverso la stimolazione delle cellule di Schwann nel produrre citochine pro-rigenerative. Inoltre, è stato ipotizzato che il BDNF possa non solo stimolare una PNR più rapida, ma anche ridurre significativamente il dolore neuropatico nel modello di ratto.

Tuttavia, è stato dimostrato che, mentre dosi ridotte di BDNF hanno promosso la rigenerazione assonale dei motoneuroni cronicamente danneggiati, dosi elevate hanno portato a una significativa inibizione della rigenerazione assonale motoria. [28, 29]

4.3.3 Fattore neurotrofico derivante dalle cellule gliali (GDNF)

Il GDNF è un NTF secreto dalle cellule di Schwann dopo una lesione nervosa noto per migliorare la sopravvivenza dei neuroni motori/sensoriali, la crescita dei neuriti (figura 4.7) e la migrazione delle cellule di Schwann. È stato inoltre utilizzato per alleviare il dolore dei neuroni sensoriali in caso di denervazione cronica.

Wood et al., nel 2009 [45], hanno condotto uno studio in cui è stata inserita una matrice di fibrina, con immobilizzate GDNF ed eparina, all'interno di una guida nervosa in silicone per colmare un difetto del nervo sciatico di 13 mm nel ratto. La presenza di GDNF e fibrina ha permesso di ottenere un'area mielinizzata/non mielinizzata molto ampia e un livello di rigenerazione nervosa paragonabile a quello di un allotrapianto in termini di densità di fibre nervose e di percentuale di rigenerazione del tessuto neurale. Tuttavia, data la difficoltà nell'ottenere il giusto dosaggio di GDNF rilasciato, la maggior parte delle recenti strategie di PNR si concentrano su terapie cellulari o geniche. Per questo scopo, nel 2013 [46] è stato condotto uno studio in cui le cellule di Schwann sono state precedentemente ingegnerizzate. Quando queste cellule modificate sono state iniettate in nervi periferici recisi e sono state sottoposte a una somministrazione limitata nel tempo di doxiciclina, è stato possibile dimostrare che l'espressione del GDNF nelle cellule di Schwann può essere strettamente controllata e monitorata con la doxiciclina. [28, 29]

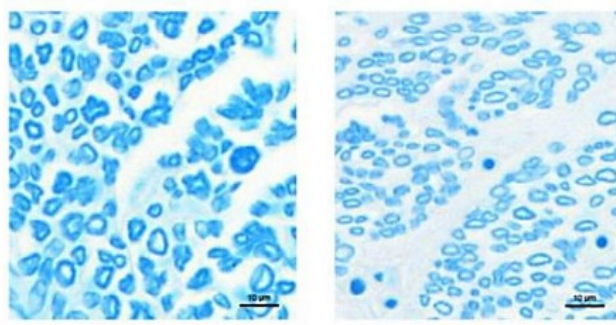


Figura 4.7: immagini di sezioni trasversali di nervo alla 12^o settimana dall'impianto di: autoinnesto (a sinistra) e NGC con ancorato GDNF (a destra). [60]

5. Tecniche di Fabbricazione delle neuroguide

Le tecniche di fabbricazione per la produzione di NGC possono essere: *Solvent Casting*, *Dip Coating*, *Injection Molding*, *Freeze drying*, *Rolling Method*, Elettrofilatura (*Electrospinning*) e *3D Bioprinting*.

5.1 Solvent Casting

La *Solvent Casting* è la tecnica più economica e semplice per la fabbricazione di NGC porosi. Essa si realizza in più step: il polimero viene sciolto in un solvente organico; viene aggiunto un porogeno o le particelle che formeranno i pori; la miscela viene modellata con uno stampo in base alla geometria finale desiderata; il solvente organico evapora e il porogeno viene rimosso con un solvente appropriato, così da ottenere una struttura porosa.

Questo processo presenta diversi svantaggi come: l'uso di solventi altamente tossici, la possibile produzione di membrane troppo sottili, la formazione di pori irregolari, la scarsa interconnessione dei pori e la bassa porosità (< 50%). Per rimediare agli ultimi due punti, questa tecnica viene combinata con il processo di Lisciviazione con sale (*salt leaching process*). Questo processo consiste nell'aggiunta di sale avente un diametro specifico alla miscela polimerica; che, a seguito dell'evaporazione del solvente e dell'immersione in acqua, fuoriesce producendo una struttura altamente porosa. Grazie a questo metodo si possono ottenere diametri dei pori fino a 500 μm e porosità fino al 93%. Tuttavia, lo svantaggio principale è la presenza di particelle residue rimaste nella matrice polimerica. [2, 47]

5.2 Dip Coating

Il metodo di *Dip Coating* è una tecnologia ampiamente utilizzata per la produzione di NGC. Il processo di fabbricazione consiste in: preparazione dell'emulsione polimerica sciogliendo i polimeri in solventi; immersione di uno stampo cilindrico nell'emulsione polimerica preparata; rimozione dello stampo dall'emulsione polimerica e solidificazione dell'emulsione polimerica tramite evaporazione o polimerizzazione; rimozione dello stampo, così da produrre una struttura a condotto (figura 5.1).

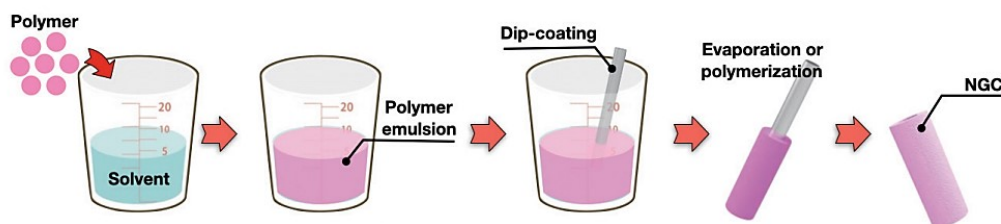


Figura 5.1: metodo Dip Coating. [48]

I vantaggi del *Dip Coating* sono la semplice procedura e il facile controllo dello spessore. Tuttavia, questo metodo non porta alla formazione di pori, utili per il trasporto dei nutrienti sulla parete del condotto. [48]

5.3 Freeze-drying

La tecnica di *Freeze-drying* viene utilizzata per fabbricare condotti polimerici porosi.

Il processo prevede due fasi:

1. Congelamento: la soluzione polimerica viene raffreddata a una certa temperatura in modo tale che i materiali presenti nella soluzione siano in uno stato di congelamento. Il solvente forma cristalli di ghiaccio, costringendo così le molecole polimeriche ad aggregarsi negli spazi interstiziali formatisi.
2. Rimozione del solvente: viene applicata una pressione inferiore alla tensione di vapore di equilibrio del solvente congelato. In questo modo, il solvente viene completamente sublimato, lasciando così una struttura polimerica porosa.

Il principale vantaggio di questo processo consiste nella possibile porosità superiore al 90%. Contrariamente, gli svantaggi includono il lungo tempo di lavorazione, le dimensioni ridotte dei pori e la forma irregolare di questi ultimi, rispetto agli *scaffold* prodotti con la *Solvent Casting*. [2, 48]

5.4 Electrospinning

L'Elettrofilatura è la tecnica tessile più utilizzata per la realizzazione di NGC; in particolare per la preparazione di fibre su scala micro e nanometrica.

Il metodo comprende quattro elementi principali: un'alta tensione, una pompa a propulsione, una siringa e un dispositivo di ricezione.

Il processo consiste in:

1. applicazione di una tensione alla soluzione polimerica;
2. accumulo della soluzione polimerica sulla punta dell'ago della siringa con conseguente formazione di una goccia (cono di Taylor). Le cariche accumulandosi sulla superficie della soluzione generano una forza repulsiva tra loro; la soluzione polimerica supera la tensione superficiale e fuoriesce, generando un getto di materiale;
3. deposito della fibra polimerica sul dispositivo di ricezione simultaneamente all'evaporazione del solvente e alla reticolazione.

I principali vantaggi dell'*Electrospinning* comprendono l'ampia scelta dei materiali da utilizzare (polimeri sintetici e naturali o copolimeri) e la produzione di nanofibre adatte per

legare e rilasciare molecole bioattive. Mentre, gli svantaggi consistono nella difficile scalabilità e riproducibilità, a causa della casualità con cui sono disposte le nanofibre. [2, 48, 49]

5.5 3D Bioprinting

Lo sviluppo di condotti specifici per il paziente, con dimensioni e risoluzione su scala nativa rappresenta tuttora un problema dell'ingegneria tissutale. Per questo motivo sono stati sviluppati i metodi di produzione additiva (AM). Ognuno di questi metodi richiede un modello digitale 3D di un condotto nervoso, che può essere ottenuto da un software di modellazione 3D o da tecniche di *imaging*. Questi modelli 3D vengono poi convertiti in un linguaggio stampabile e importati in macchine di prototipazione rapida controllate da computer per il processo di stampa.

La tecnologia di stampa tridimensionale comprende: Stereolitografia (*Stereolithography*), *Digital Light Processing*, *Inkjet based Bioprinting*, *Laser Assisted Bioprinting* ed *Extrusion based Bioprinting*.

5.5.1 Stereolitografia

La stereolitografia (SLA) è la prima tecnica AM brevettata e commercializzata per creare prototipi 3D per diverse applicazioni.

La maggior parte delle stampanti 3D basate su SLA è dotata di una sorgente laser di polimerizzazione a bassa potenza (lunghezze d'onda UV/visibili), di un serbatoio riempito di resina fotopolimerica, di una piattaforma ricevente mobile e di un'interfaccia informatica per controllare il movimento della sorgente laser e del ricevitore (figura 5.2).

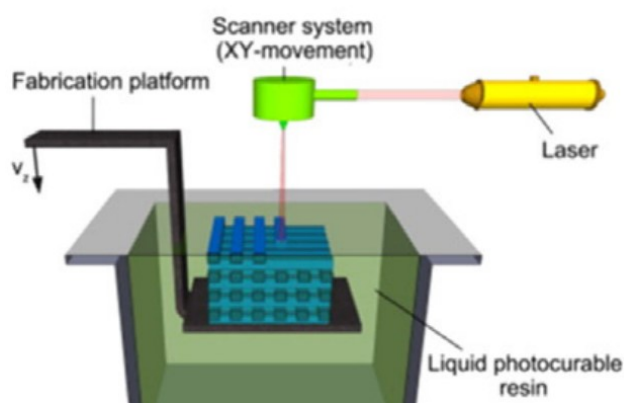


Figura 5.2: Stereolitografia [47]

Il processo SLA prevede la ripetizione di alcuni step fino al completo sviluppo della struttura:

1. fotopolimerizzazione delle resine fotosensibili da parte del laser, che viene focalizzato in un singolo punto tramite specchi deflettori o *micromirror array* digitali in regioni selettive, secondo il *pattern* 3D predefinito;

2. abbassamento della piattaforma del ricevitore, una volta sviluppato il primo strato, secondo lo spessore dello strato desiderato;
3. resinatura e fotopolimerizzazione del secondo strato.

Questa tecnica permette di creare prodotti con un'elevata accuratezza e precisione geometrica, e permette lo sviluppo di strutture caricate o seminate di cellule con una maggiore risoluzione e vitalità, utilizzando polimeri fotoattivi biocompatibili (resine). Inoltre, la maggior parte degli strumenti SLA utilizza laser a luce visibile rispetto ai laser UV nelle applicazioni biomediche, evitando così alterazioni citoplasmatiche e genomiche nelle cellule utilizzate. Tuttavia, si tratta di un processo relativamente lungo e discontinuo, che richiede ulteriori fasi di post-elaborazione per solidificare completamente le parti stampate e ottenere modelli 3D meccanicamente resistenti e stabili. [47]

5.5.2 Digital Light Processing

Il *Digital Light Processing* (DLP) impiega la luce UV/visibile intermittente attraverso un proiettore di luce digitale per polimerizzare la resina fotoattiva strato per strato, secondo il progetto CAD (Progettazione assistita da computer).

I componenti principali di un sistema DLP comprendono una sorgente di luce UV/visibile, un serbatoio di resina, un dispositivo digitale a specchio e una piastra ricevente mobile (figura 5.3).

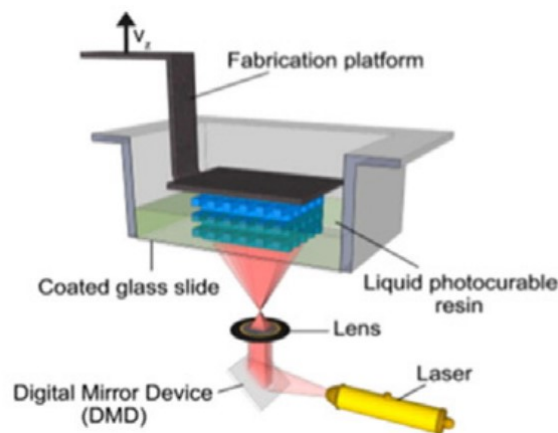


Figura 5.3: Digital Light Processing. [47]

Il principale vantaggio del DLP è la produzione rapida di strutture 3D con una durata di stampa ridotta rispetto al processo SLA. Mentre, i principali svantaggi consistono nella scelta limitata di bioresine fotopolimerizzabili, nel forte odore dovuto alla polimerizzazione, nell'elevato spreco di resine che si traduce in un costo elevato di produzione e nella necessità di controllare la citotossicità del materiale.

Nel 2020, Ye et al. [50] hanno progettato e fabbricato una neuroguida multicanale a base di gelatina metacrilata (GelMA) utilizzando una stampante 3D DLP commerciale. Generalmente,

la qualità delle strutture stampate con tecnologia DLP viene determinata in base allo spessore dello strato, alla durata dell'esposizione alla luce e all'intensità della luce. Di conseguenza, in questo studio, la durata dell'esposizione alla luce è stata variata per ottenere NGC multicanale di dimensioni desiderate e con una resistenza meccanica sufficiente, pari ai tessuti nativi. La fabbricazione di condotti con una durata minima di esposizione alla luce (< 20 s) e con una sovraesposizione alla luce (>50 s) ha sviluppato rispettivamente condotti meccanicamente instabili e più fragili. Tuttavia, i condotti fabbricati con una durata di esposizione ottimale (~35 s) hanno prodotto condotti flessibili senza alcuna deformazione alla compressione. Inoltre, la fabbricazione basata su DLP di cinque condotti in GelMA è stata ottenuta in 15 minuti e 5 secondi, con un'elevata riproducibilità. Le immagini microscopiche dei condotti in GelMA stampati erano simili a quelle del modello 3D progettato, confermando la DLP come tecnica rapida e accurata per sviluppare architetture nervose complesse. [47, 48]

5.5.3 Inkjet based Bioprinting

La *Inkjet based Bioprinting* è generalmente una tecnica di microstampa *drop-on-demand* (DOD), senza contatto, a bassa temperatura e a bassa pressione, che prevede la deposizione e il posizionamento controllati di gocce uniformi, provenienti da una cartuccia di inchiostro, sul substrato posto a una distanza minima dalla cartuccia.

La biostampante è costituita da una cartuccia di erogazione caricata con *bioink* e da un substrato ricevente, che si muovono su tre assi per riprodurre il *design* digitale. A seconda del meccanismo di erogazione delle gocce, questa tecnica può essere classificata come getto d'inchiostro continuo e getto d'inchiostro DOD.

In base alla generazione di gocce, le stampanti a getto d'inchiostro DOD sono ulteriormente classificate in:

- Stampanti a base termica (figura 5.4): utilizzano energia termica localizzata per generare bolle di calore all'interno della cartuccia, che espandendosi causano l'espulsione di gocce attraverso l'ugello. I vantaggi del metodo di stampa 3D a getto d'inchiostro termico è la velocità di stampa e il basso costo delle apparecchiature. Tuttavia, il controllo dell'espulsione delle gocce rappresenta la principale difficoltà.
- Stampanti a base di attuatori piezoelettrici (figura 5.4): impiegano una tensione sul materiale piezoelettrico collegato all'ugello, causando un'improvvisa variazione del volume della cartuccia e provocando la formazione di gocce.

- Stampanti a base elettrostatica: applicano una corrente elettrica a una piastra, causando l'espansione della cartuccia e provocando la formazione di gocce.

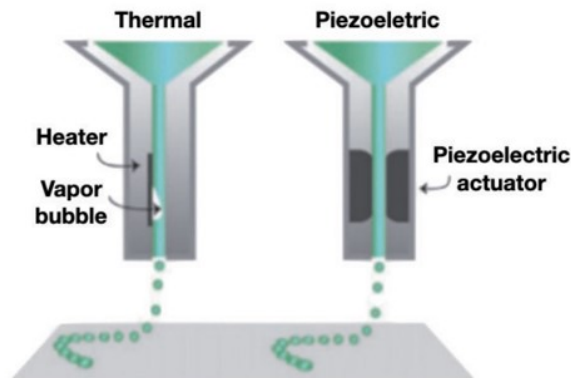


Figura 5.4: Inkjet based Bioprinting. [48]

Purtroppo, la deposizione di inchiostri ad alta viscosità con queste stampanti richiede un aumento della temperatura e della corrente di deposizione, con conseguenti danni alle biomolecole incorporate, intasamento dell'ugello e incapsulamento cellulare inaffidabile. Ciò richiede l'introduzione un valore massimo per la viscosità del bioinchiostro. [47, 48]

5.5.4 Laser Assisted Bioprinting

Il *Bioprinting* laser-assistito (LAB) è un metodo senza contatto che utilizza il laser per depositare su un substrato gocce provenienti da un sottile strato di bioinchiostro (figura 5.5).

Questo metodo è composto principalmente da tre componenti essenziali:

1. laser a impulsi o a onda continua: utilizzato come fonte di energia;
2. donatore: solitamente costituito da un vetrino di quarzo/vetro rivestito con uno strato sacrificale, seguito da uno strato di bioinchiostro di spessore micrometrico;
3. substrato ricevente.

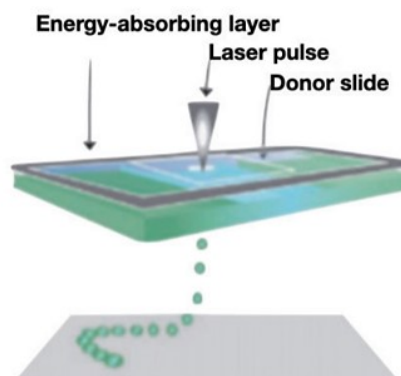


Figura 5.5: Laser Assisted Bioprinting. [48]

Quando il laser colpisce il donatore, lo strato sacrificale (o parte dello strato di bioinchiostro) evapora formando una bolla di vapore, che si espande e si contrae a causa della pressione, causando la caduta del bioinchiostro sotto forma di gocce verso il ricevitore.

Diversi fattori influenzano la risoluzione delle gocce, tra cui le proprietà reologiche del bioinchiostro, lo spessore di rivestimento del bioinchiostro, l'energia e la frequenza dell'impulso laser, la velocità di stampa e la distanza tra donatore e substrato. Essendo un metodo privo di ugello, è possibile evitare sia l'intasamento di quest'ultimo sia i danni cellulari indotti da taglio. Tuttavia, lo sviluppo di strutture spesse ($> 1-2$ mm), i lunghi tempi di preparazione del materiale, le contaminazioni dovute a piccole quantità di componenti metallici, i danni cellulari causati dall'esposizione laser e i costi elevati, sono aspetti da valutare. [23, 47]

5.5.5 *Extrusion based Bioprinting*

L'*Extrusion based Bioprinting* (EBB) è un metodo di produzione di strutture 3D mediante l'estrusione e il deposito di materiali utilizzando dispositivi pneumatici, pistoni, viti e ugelli.

In base al metodo di estrusione (figura 5.6), le biostampanti sono classificate come:

- a base pneumatica: utilizzano aria compressa o N_2 , riducono al minimo la contaminazione microbica grazie all'uso di una camera d'aria con filtro sterile e consentono un'estrusione omogenea di bioinchiostri liquidi e in gel;
- a forza meccanica: utilizzano quest'ultima per far uscire i bioinchiostri dall'ugello a una portata e a un volume controllati. Nella tipologia a pistone può essere ottenuto un flusso controllato di *bioink* e nella tipologia basata sull'estrusione a vite può essere ottenuta la miscelazione uniforme delle cellule all'interno della matrice di *bioink*. Tuttavia, queste biostampanti causano danni alle cellule (data l'applicazione di elevate pressioni) e aumentano il rischio di contaminazione.

I vantaggi dell'EBB consistono in una buona stampabilità, vitalità cellulare e capacità di stampare un'ampia varietà di materiali idrogel. Tuttavia, il principale limite è costituito dalla scarsa efficienza e accuratezza di stampa, dovuta all'utilizzo di un ugello che è soggetto a bloccarsi. [47, 48, 51]

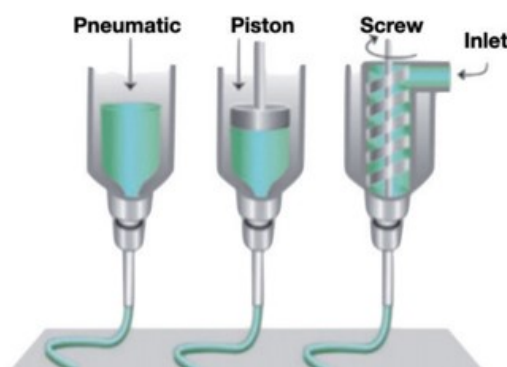


Figura 5.6: *Extrusion based Bioprinting*. [48]

Conclusioni

Le lesioni al sistema nervoso periferico rappresentano un onere medico significativo. Queste lesioni portano spesso alla perdita della funzione motoria e/o sensoriale, cosa che influisce significativamente sulla qualità di vita dei pazienti. L'approccio chirurgico più adottato per la riparazione dei nervi periferici prevede il trapianto di nervi autologhi, ciò spesso porta a complicazioni cliniche. La percentuale di successo nel trattamento delle PNIs è lontana dall'essere ottimale, malgrado i progressi ottenuti dalla microchirurgia.

I condotti nervosi sono un'alternativa promettente all'autotrapianto nervoso; tuttavia, il loro uso è attualmente limitato ai nervi periferici di piccolo diametro con difetti di piccole dimensioni.

Per aumentare la capacità rigenerativa delle guide nervose attualmente disponibili in commercio, sono stati adottati diversi approcci combinatori sia in ambito clinico che di ricerca. Per la fabbricazione di NGC funzionali occorre prestare attenzione al materiale e al *design*, poiché giocano un ruolo importante. È stato dimostrato che i dispositivi realizzati con materiali combinati possiedono migliori proprietà meccaniche e funzioni biologiche rispetto a quelli realizzati con materiali singoli. Tramite modifiche al *design*, sono stati ottenuti risultati promettenti, in particolare grazie ai *design* poroso e multicanale, poiché offrono dei segnali fisici per la rigenerazione assonale diretta. Inoltre, la realizzazione di NGC con *filler* lumenali, che prevede l'incorporazione nelle neuroguide di fattori neurotrofici, cellule staminali e componenti strutturali, dimostra sempre più di poter essere un'alternativa al *gold standard* in caso di lesioni estese.

Negli ultimi anni, la tecnologia di stampa 3D ha aperto molte opportunità per quanto riguarda la fabbricazione di neuroguide che imitano le dimensioni macro e micro-architettoniche del nervo. Questa tecnologia, rispetto agli approcci tradizionali, offre un approccio integrato per la combinazione di materiali naturali e sintetici, cellule di supporto, fattori di crescita e forme/dimensioni specifiche per il destinatario del dispositivo.

La scelta del metodo di bioprinting deve basarsi sui biomateriali utilizzati, sulla topologia della neuroguida e sul costo di fabbricazione. In particolare, la tecnica di *Digital Light Processing* si è dimostrata adatta nel fabbricare condotti multicanale in modo veloce ed efficace.

Purtroppo, queste strategie sono state esplorate solo in minima parte nelle applicazioni cliniche e richiedono la generazione di conoscenze approfondite attraverso un'ampia ricerca.

Acronimi

ADSC = cellule staminali di origine adiposa

BDNF = fattore neurotrofico cerebrale

CNTF = fattore neurotrofico ciliare

CS = chitosano

DLP = *Digital Light Processing*

DOD = *drop-on-demand*

DRG = gangli della radice dorsale

EBB = *Extrusion based Bioprinting*

ECM = matrice extracellulare

FDA = Food and Drug Administration

GDNF = fattore neurotrofico derivato dalle cellule gliali

LAB = *Bioprinting* laser-assistito

LN = laminina

MSC = cellule staminali mesenchimali

NGC = guide neurali o condotti di guida nervosa

NGF = fattore di crescita nervosa

NT-3 = neurotrofina-3 / NT-4 = neurotrofina-4

NTF = fattore neurotrofico

OEC = cellule di rivestimento olfattivo

PCL = policaprolattone

P(DLLA-co-CL) = poli-DL lattato- ϵ -caprolattone

PGA = acido poliglicolico

PLA = acido poli lattico

PLGA = acido poli(lattico-co-glicolico)

PNI = lesione dei nervi periferici / PNIs = lesioni dei nervi periferici

PNR = rigenerazione dei nervi periferici

SC = cellule di Schwann

SEM = microscopio elettronico a scansione

SF = fibroina della seta

SLA = stereolitografia

SNC = sistema nervoso centrale

SNP = sistema nervoso periferico

TE = ingegneria tissutale

Bibliografia

- [1] A. De Santanna, F. Ghiotto and A. More, “Il tessuto nervoso,” in *Atlante di Istologia*, Genova, Dipartimento di Medicina Sperimentale-Università di Genova, 2016, pp. 91-97.
- [2] S. Vijayavenkataraman, “Nerve guide conduits for peripheral nerve injury repair: A review on design, materials and fabrication methods,” *Acta Biomaterialia*, vol. 106, p. 54–69, 2020.
- [3] J. B. Parker, I. D. Rhodes, M. C. O’Brien, E. A. Rodda and R. N. Cameron, “Nerve guidance conduit development for primary treatment of peripheral nerve transection injuries: A commercial perspective,” *Acta Biomaterialia*, vol. 135, pp. 64-86, 2021.
- [4] M. Griffin, M. Malahias, S. Hindocha and W. S. Khan, “Peripheral Nerve Injury: Principles for Repair and Regeneration,” *The Open Orthopaedics Journal*, vol. 8, pp. 199-203, 2014.
- [5] S. Yi, Y. Zhang, X. Gu, L. Huang, K. Zhang, T. Qian and X. Gu, “Application of stem cells in peripheral nerve regeneration,” *Burns & Trauma*, vol. 8, p. tkaa002, 2020.
- [6] Y. Kaya and L. Sarikcioglu, “Sir Herbert Seddon (1903–1977) and his classification scheme for peripheral nerve injury,” *Childs Nerv Syst*, vol. 31, pp. 177-180, 2015.
- [7] Z. W. Ray and E. S. Mackinnon, “Management of nerve gaps: Autografts, allografts, nerve transfers, and end-to-side neurotaphy,” *Experimental Neurology*, vol. 223, pp. 77-85, 2010.
- [8] K. Brattain, “Analysis of the peripheral nerve repair market in the United States,” *Magellan Medical Technology Consultants*, p. 1–11, 2013.
- [9] R. Rebowe, A. Rogers, X. Yang, S. C. Kundu, T. L. Smith and Z. Li, “Nerve Repair with Nerve Conduits: Problems, Solutions, and Future Directions,” *Journal of Hand and Microsurgery*, vol. 10, pp. 61-65, 2018.
- [10] A. Merolli, M. Masciangelo, A. Morini, L. Mingarelli, R. De Vitis, A. Militerno, L. Rocchi and F. Catalano, “La rigenerazione dei nervi periferici mediante guide neurali artificiali: l'applicazione clinica e la ricerca sperimentale,” *GIOT*, vol. 37, pp. 198-205, 2011.
- [11] S. Kehoe, X. Zhang and D. Boyd, “FDA approved guidance conduits and wraps for peripheral nerve injury: A review of materials and efficacy,” *Injury*, vol. 43, pp. 553-572, 2012.
- [12] https://www.synovismicro.com/html/products/gem_neurotube.html.
- [13] <https://bioproimplants.com/portfolio-view/neurolac>.
- [14] <https://axogeninc.eu/axoguard-nerve-connector/>.
- [15] S. O. Manoukian, T. J. Baker, S. Rudraiah, R. M. Arul, T. A. Vella, J. A. Domb and G. S. Kumbar, “Functional polymeric nerve guidance conduits and drug delivery strategies for peripheral nerve repair and regeneration,” *Journal of Controlled Release*, pp. 78-95, 2020.
- [16] H. Jiang, Y. Qian, C. Fan and Y. Ouyang, “Polymeric Guide Conduits for Peripheral Nerve Tissue Engineering,” *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 8, pp. 582-646, 2020.
- [17] X. Liu, C. Zheng, X. Luo, X. Wang and H. Jiang, “Recent advances of collagen-based biomaterials: Multi-hierarchical structure, modification and biomedical applications,” *Materials Science & Engineering C*, vol. 99, pp. 1509-1522, 2019.
- [18] A. C. Pinho, A. C. Fonseca, A. C. Serra, J. D. Santos and J. F. J. Coelho, “Peripheral Nerve Regeneration: Current Status and New Strategies Using Polymeric Materials,” *Advanced Healthcare Materials*, vol. 5, pp. 2732-2744, 2016.

- [19] S. Houshyar, A. Bhattacharyya and R. Shanks, "Peripheral Nerve Conduit: Materials and Structures," *ACS Chemical Neuroscience*, vol. 10, pp. 3349-3365, 2019.
- [20] C. Lujerdean, G.-M. Baci, A.-A. Cucu and D. Dezmirean, "The Contribution of Silk Fibroin in Biomedical Engineering," *Insects*, vol. 13, p. 286, 2022.
- [21] R. Singh, S. Gautam, B. Sharma, P. Jain and K. D. Chauhan, "Chapter 2 - Biopolymers and their classifications," in *Biopolymers and their Industrial Applications*, Sabu Thomas, Sreeraj Gopi, Augustine Amalraj, 2021, pp. 21-44.
- [22] M. Zhang, H. An, F. Zhang, H. Jiang, T. Wan, Y. Wen, N. Han and P. Zhang, "Prospects of Using Chitosan-Based Biopolymers in the Treatment of Peripheral Nerve Injuries," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 24(16), p. 12956, 2023.
- [23] Y. Yan, R. Yao, J. Zhao, K. Chen, L. Duan, T. Wang, S. Zhang, J. Guan, Z. Zheng, X. Wang, Z. Liu, Y. Li and G. Li, "Implantable nerve guidance conduits: Material combinations, multi-functional strategies and advanced engineering innovations," *Bioactive Materials*, vol. 11, pp. 57-76, 2022.
- [24] D. A. Mackinnon SE, "Clinical nerve reconstruction with a bioabsorbable polyglycolic acid tube," *Plast Reconstr Surg.*, vol. 83, pp. 419-424, 1990.
- [25] X. Zhang, W. Qu, D. Li, K. Shi, R. Li, Y. Han, . E. Jin, J. Ding and X. Chen, "Functional Polymer-Based Nerve Guide Conduits to Promote Peripheral Nerve Regeneration," *Adv. Mater. Interfaces*, vol. 7, p. 2000225, 2020.
- [26] M. Sarker, S. Naghieh, A. McInnes, D. Schreyer and X. Chen, "Strategic Design and Fabrication of Nerve Guidance Conduits for Peripheral Nerve Regeneration," *Biotechnol J.*, vol. 13, p. 1700635, 2018.
- [27] V. Chiono and C. Tonda-Turo, "Trends in the design of nerve guidance channels in peripheral nerve tissue engineering," *Progress in Neurobiology*, vol. 131, pp. 87-104, 2015.
- [28] X. Jiang, S. H. Lim, H.-Q. Mao and S. Y. Chew, "Current applications and future perspectives of artificial nerve conduits," *Experimental Neurology*, vol. 223, p. 86-101, 2010.
- [29] R. C. Carvalho, M. J. Oliveira and L. R. Reis, "Modern Trends for Peripheral Nerve Repair and Regeneration: Beyond the Hollow Nerve Guidance Conduit," *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 7, pp. 2296-4185, 2019.
- [30] V. Guénard, N. Kleitman, T. Morrissey, R. Bunge and P. Aebischer, "Syngeneic Schwann cells derived from adult nerves seeded in semipermeable guidance channels enhance peripheral nerve regeneration," *J Neurosci*, vol. 12, pp. 3310-20, 1992.
- [31] G. Rutkowski and C. Heath, "Development of a bioartificial nerve graft. II. Nerve regeneration in vitro," *Biotechnol Prog*, vol. 18, pp. 373-9, 2002.
- [32] F. Stang, H. Fansa, G. Wolf, M. Reppin and G. Keilhoff, "Structural parameters of collagen nerve grafts influence peripheral nerve regeneration," *Biomaterials*, vol. 26, pp. 3083-91, 2005.
- [33] M. Chen, F. Zhang and W. Lineaweaver, "Luminal fillers in nerve conduits for peripheral nerve repair," *Ann Plast Surg*, vol. 57, pp. 462-71, 2006.
- [34] E. Stocco, S. Barbon, A. Emmi, C. Tiengo, V. Macchi, R. De Caro and A. Porzionato, "Bridging Gaps in Peripheral Nerves: From Current Strategies to Future Perspectives in Conduit Design," *Int J Mol Sci*, vol. 24, p. 9170, 2023.
- [35] M. Zhang, M. Jiang, D. Kim, W. Ahn, E. Chung, Y. Son and G. Chi, "Comparative Analysis of the Cell Fates of Induced Schwann Cells from Subcutaneous Fat Tissue and Naïve Schwann Cells in the Sciatic Nerve Injury Model," *BioMed Research International*, p. 1252851, 2017.

- [36] T. Mimura, M. Dezawa, H. Kanno, H. Sawada and I. Yamamoto, "Peripheral nerve regeneration by transplantation of bone marrow stromal cell-derived Schwann cells in adult rats," *J Neurosurg*, vol. 101, pp. 806-12, 2004.
- [37] A. De Luca, C. Fonta, W. Raffoul, P. di Summa and S. Lacour, "In vitro evaluation of gel-encapsulated adipose derived stem cells: Biochemical cues for in vivo peripheral nerve repair," *J Tissue Eng Regen Med*, vol. 12, pp. 676-686, 2018.
- [38] J. Rosen, J. Padilla, K. Nguyen, M. Padilla, E. Sabelman and H. Pham, "Artificial nerve graft using collagen as an extracellular matrix for nerve repair compared with sutured autograft in a rat model," *Ann Plast Surg*, vol. 25, pp. 375-87, 1990.
- [39] F. Stang, H. Fansa, G. Wolf, M. Reppin and G. Keilhoff, "Structural parameters of collagen nerve grafts influence peripheral nerve regeneration," *Biomaterials*, vol. 26, pp. 3083-3091, 2005.
- [40] X. Yu and R. Bellamkonda, "Tissue-engineered scaffolds are effective alternatives to autografts for bridging peripheral nerve gaps," *Tissue Eng.*, vol. 9, pp. 421-30, 2003.
- [41] J. Du, J. Liu, S. Y. H. Mao, J. Peng, X. Sun, Z. Cao, Y. Yang, B. Xiao, Y. Wang, P. Tang and X. Wang, "Prompt peripheral nerve regeneration induced by a hierarchically aligned fibrin nanofiber hydrogel," *Acta Biomaterialia*, vol. 55, pp. 296-309, 2017.
- [42] A. Quigley, K. Bulluss, I. Kyratzis, K. Gilmore, T. Mysore, K. Schirmer, E. Kennedy, M. O'Shea, Y. Truong, S. Edwards, G. Peeters, P. Herwig, J. Razal, T. Campbell, K. Lowes, M. Higgins, S. Moulton, M. Murphy, M. Cook, G. Clark, G. Wallace and R. Kapsa, "Engineering a multimodal nerve conduit for repair of injured peripheral nerve," *J Neural Eng*, vol. 10, p. 016008, 2013.
- [43] A. Piotrowicz, M. S and Shoichet, "Nerve guidance channels as drug delivery vehicles," *Biomaterials*, vol. 27, pp. 2018-2027, 2006.
- [44] A. Pabari, S. Y. Yang, A. Mosahebi and A. M. Seifalian, "Recent advances in artificial nerve conduit design: Strategies for the delivery of luminal fillers," *Journal of Controlled Release*, vol. 156, pp. 2-10, 2011.
- [45] M. Wood, A. Moore, D. Hunter, S. Tuffaha, G. Borschel, S. Mackinnon and S. Sakiyama-Elbert, "Affinity-based release of glial-derived neurotrophic factor from fibrin matrices enhances sciatic nerve regeneration," *Acta Biomater*, vol. 5, pp. 959-68, 2009.
- [46] A. Shakhbazau, C. Mohanty, D. Shcharbin, M. Bryszewska, A.-M. Caminade, J.-P. Majoral, J. Alant and R. Midha, "Doxycycline-regulated GDNF expression promotes axonal regeneration and functional recovery in transected peripheral nerve," *Journal of Controlled Release*, vol. 172, pp. 841-851, 2013.
- [47] A. Zennifer, M. Thangadurai, D. Sundaramurthi and S. Sethuraman, "Additive manufacturing of peripheral nerve conduits – Fabrication methods, design considerations and clinical challenges," *SLAS Technology*, vol. 28, pp. 102-126, 2023.
- [48] K. NU, L. SJ and G. SJ., "Fabrication Techniques of Nerve Guidance Conduits for Nerve Regeneration," *Yonsei Med J*, vol. 63, pp. 114-123, 2022.
- [49] T. Wan, Y. Wang, F. Zhang, X. Zhang, Y. Zhang, H. Jiang, M. Zhang and P. Zhang, "The Porous Structure of Peripheral Nerve Guidance Conduits: Features, Fabrication and Implications for Peripheral Nerve Regeneration," *Preprints*, 2023.
- [50] W. Ye, H. Li, K. Yu, C. Xie, P. Wang, Y. Zheng, P. Zhang, J. Xiu, Y. Yang, F. Zhang, Y. He and Q. Gao, "3D printing of gelatin methacrylate-based nerve guidance conduits with multiple channels," *Materials & Design*, vol. 192, p. 108757, 2020.

- [51] D. V. Krishna and M. R. Sankar, "Engineered approach coupled with machine learning in biofabrication of patient-specific nerve guide conduits - Review," *Bioprinting*, vol. 30, p. e00264, 2023.
- [52] M. Bosch-Queralt, R. Fledrich and R. M. Stassart, "Schwann cell functions in peripheral nerve development and repair," *Neurobiology of Disease*, vol. 176, pp. 105-952, 2023.
- [53] A. Verkhatsky, M. S. Ho and V. Parpura, "Evolution of neuroglia," *Adv Exp Med Biol.*, vol. 1175, pp. 15-44, 2019.
- [54] <https://www.integranerve.com/nerve-guide>.
- [55] <https://www.floridaortho.com/specialties/hand-and-wrist/nerve-pain/>.
- [56] <https://www.sigmaaldrich.com/IT/it/product/aldrich/457647>.
- [57] <https://www.integranerve.com/nerve-guide-matrix>.
- [58] M. Dezawa, I. Takahashi, M. Esaki, M. Takano and H. Sawada, "Sciatic nerve regeneration in rats induced by transplantation of in vitro differentiated bone-marrow stromal cells," *Eur J Neurosci*, vol. 14, pp. 1771-6, 2001.
- [59] A. Farzan, S. Borandeh and J. Seppälä, "Conductive polyurethane/PEGylated graphene oxide composite for 3D-printed nerve guidance conduits," *European Polymer Journal*, vol. 167, p. 111068, 2022.
- [60] F. Ma, F. Xu, R. Li, Y. Zheng, F. Wang, N. wei, J. zhong, Q. Tang, T. Zhu, Z. Wang and J. Zhu, "Sustained delivery of glial cell-derived neurotrophic factors in collagen conduits for facial nerve regeneration," *Acta Biomaterialia*, vol. 69, pp. 146-155, 2018.
- [61] P. Hernandez Cortes, . J. Garrido, M. Camara and F. O'valle Ravassa, "Failed digital nerve reconstruction by foreign body reaction to neurolac nerve conduit," *Microsurgery*, vol. 30, pp. 414-416, 2010.
- [62] H. S. Koh, T. Yong, W. E. Teo, C. K. Chan, M. E. Puhaindran, T. C. Tan, A. Lim, B. H. Lim and S. Ramakrishna, "In vivo study of novel nanofibrous intra-luminal guidance channels to promote nerve regeneration," *J. Neural Eng*, vol. 7, p. 046003, 2010.
- [63] K. Gladwin and D. Choi, "Olfactory Ensheathing Cells: Part I—Current Concepts and Experimental Laboratory Models," *World Neurosurgery*, vol. 83, pp. 114-119, 2015.
- [64] K. H. Makadia and J. S. Siegel, "Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier," *Polymers*, vol. 3, pp. 1377-1397, 2011.
- [65] S. Madduri, M. Papaloizos and B. Gander, "Trophically and topographically functionalized silk fibroin nerve conduits for guided peripheral nerve regeneration," *Biomaterials*, vol. 31, pp. 2323-2334, 2010.
- [66] D. Arslantunali, T. Dursun, D. Yucel, N. Hasirci and V. Hasirci, "Peripheral nerve conduits: technology update," *Medical Devices: Evidence and Research*, pp. 405-424, 2014.
- [67] T. Dinis, R. Elia, G. Vidal, Q. Dermigny, C. Denoëud, D. Kaplan, C. Egles and F. Marin, "3D multi-channel bi-functionalized silk electrospun conduits for peripheral nerve regeneration," *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, vol. 41, pp. 43-55, 2015.

*A mia nonna Giuliana che ha creduto in me fin dall'inizio
e fino alla fine, a volte anche al posto mio.*