



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA



DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

**LA RIGENERAZIONE NEURALE:
ANALISI DELLE NEUROGUIDE IMPIEGATE NELL'INGEGNERIA
TISSUTALE**

Laureando: Filippo Baliviera

Relatore: Prof. Piero Pavan

ANNO ACCADEMICO 2021 – 2022

Data di laurea 25 Novembre 2022

Ringraziamenti

Vorrei ringraziare innanzitutto il professor Pavan Piero che, con la sua esperienza, mi ha supportato nella stesura della tesi, valorizzando il mio lavoro.

Un grande ringraziamento a mia mamma Francesca e a mio papà Franco che hanno creduto in me, mi hanno dato la possibilità di intraprendere questo percorso portandolo a termine.

Proseguo ringraziando i miei familiari, zii e parenti tutti, un pensiero speciale a mia nonna Maria, per la loro presenza e il loro sostegno.

Ringrazio Gaia e i miei amici, nessuno escluso, che mi hanno spronato a dare sempre il meglio e mi sono stati vicini nei momenti di gioia e di difficoltà.

È grazie a tutti voi, con il vostro sostegno quotidiano, che oggi posso festeggiare e condividere con voi questa grande emozione.

A voi dedico questo lavoro, vi voglio bene.

Grazie.

Filippo Baliviera

Indice

Abstract	8
Introduzione	9
Capitolo I: Anatomia funzionale del sistema nervoso	11
1.1 Cellule del sistema nervoso	13
1.2 Sistema nervoso periferico	16
1.2.1 Struttura dei nervi periferici	17
1.2.2 Lesioni dei nervi periferici	19
Capitolo II: Ingegneria tissutale	23
2.1 Principi dell'ingegneria tissutale	25
2.2 Biomolecole	27
2.3 Biomimetica	27
2.4 Cellule utilizzate nell'ingegneria tissutale	28
2.4.1 Cellule staminali	29
2.4.2 Cellule differenziate	29
2.5 Biomateriali	30
2.5.1 Biocompatibilità	31
2.5.2 Biodegradazione	31
2.6 Scaffold	32
2.6.1 Scaffold neurali	34
Capitolo III: Innesti autologhi, il trattamento gold-standard	37
Capitolo IV: Neuroguide per la rigenerazione neurale	43
4.1 Descrizione delle neuroguide	45
4.2 Confronto con gli innesti autologhi	46
4.3 Caratteristiche delle neuroguide	47

4.4	Design delle neuroguide	51
4.5	Neuroguide realizzate con polimeri naturali	53
4.5.1	Collagene	53
4.5.2	Chitosano	54
4.5.3	Fibroina della seta	55
4.5.4	Alginato	55
4.5.5	Poliidrossibutirrato e poliidrossivalerato	56
4.6	Neuroguide realizzate con polimeri sintetici	56
4.6.1	Alcool polivinilico (PVA)	56
4.6.2	Policaprolattone (PCL)	57
4.6.3	Copolimeri di acido polilattico (PLA) e di policaprolattone (PLC)	58
4.6.4	Acido poliglicolico (PGA)	58
4.6.5	Acido poli(lattico-co-glicolico) (PLGA)	58
4.6.6	Acido polisialico (PSA)	59
4.7	Neuroguide realizzate con materiali compositi a matrice polimerica	59
4.8	Neuroguide realizzate con polimeri conduttivi	59
4.9	Aspetti morfologici interni	60
4.10	Utilizzo delle nanotecnologie	61
4.11	Tecniche di fabbricazione	62
4.12	Dispositivi disponibili in commercio	64
4.12.1	NeuraGen® e NeuraWrap®	64
4.12.2	Reaxon® direct e Reaxon® nerve guide	66
Capitolo V: Risultati ed evidenze raccolte dai casi clinici analizzati dalla letteratura		67
5.1	Neuroguide realizzate con costrutti di fibre allineate	69
5.2	Incorporazione delle cellule staminali all'interno delle neuroguide	73

5.3	Confronto tra il condotto neuraGeN e l'innesto Avance per la ricostruzione del gap nervoso	75
5.4	Caso di studio per il confronto di autotrapianto e condotti nervosi di collagene	77
5.5	Confronto della rigenerazione prodotta attraverso autotrapianti, allograpianti Axogen e condotti a base di collagene.	78
5.6	Confronto tra neuroguide realizzate in alcol polivinilico ossidato e una membrana naturale di leucociti-fibrina-piastrine	79
5.7	Studio dell'utilizzo di microcanali per produrre materiali biomimetici funzionali per la realizzazione di neuroguide	81
5.8	Studio dell'utilizzo delle proteine della soia per la rigenerazione neurale	82
	Conclusioni	85
	Bibliografia e sitologia	87

Abstract

Obiettivo di questa ricerca è l'analisi della letteratura scientifica riguardo il tema della rigenerazione dei nervi periferici, nella riparazione di lesioni mediante l'utilizzo delle neuroguide. Una lesione del tessuto nervoso è causa di deficit funzionali, più o meno rilevanti, che possono influire in modo significativo nella qualità della vita di una persona. La rigenerazione neurale è diventata per questo motivo importante argomento di studio per la medicina rigenerativa e l'ingegneria tissutale; si propone l'obiettivo di migliorare la qualità della vita del soggetto, permettendo di sostituire il tessuto nervoso danneggiato o rigenerando quello esistente. Partendo da uno studio anatomico/funzionale del sistema nervoso, osservando le cellule da cui è composto e le loro caratteristiche funzionali, sono state analizzate diverse tecniche e metodologie di riparazione tissutale dei nervi periferici mediante l'impiego di autoinnesti nervosi e neuroguide. Nel dettaglio si analizza come la letteratura scientifica descrive l'operazione di rigenerazione neurale attraverso l'utilizzo di neuroguide, o condotti di guida nervosi, realizzate in materiali sintetici o naturali. Tali condotti funzionano come strutture di raccordo suture, o fissate ai due monconi del nervo danneggiato, allo scopo di favorire la rigenerazione del tessuto nervoso fornendo un ambiente adeguato alla rigenerazione del nervo e fungendo, al contempo, sia da guida per la rigenerazione degli assoni, sia da barriera contro gli attacchi dell'ambiente biologico e la crescita cicatriziale. L'obiettivo di questo studio è dunque caratterizzare morfologicamente diversi campioni di neuroguide in modo da valutarne la funzionalità *in vivo*, determinando le caratteristiche, il design, i fattori biochimici e i materiali che risultano più adatti ed efficienti per questo scopo, ma anche maggiormente biocompatibili con il nostro organismo, a seconda dell'obiettivo e della sede di innesto.

Introduzione

Il sistema nervoso è l'insieme degli organi e delle strutture che, permette di trasmettere segnali tra le diverse parti del corpo e di coordinare azioni e funzioni volontarie, involontarie, fisiche e psicologiche.

A seguito di infortuni di vario genere, i nervi possono lesionarsi o rompersi, causando seri problemi all'infortunato, generando rischi di disabilità cronica che possono incidere in modo significativo la qualità della vita.

Le cause sono principalmente dovute a traumi fisici di grave entità, come una caduta o un forte impatto, un taglio o un'esplosione, tali da compromettere l'integrità dei nervi, causando un danno alle fibre nervose a seguito del quale il nervo muore distalmente con successiva degenerazione assonica.

I sintomi legati a questi eventi traumatici dipendono dal tipo di lesione e se questa interessa un nervo sensoriale (adibito al trasporto delle informazioni) o un nervo motorio (adibito al controllo del movimento muscolare); inoltre, variano anche in base all'entità, alla tipologia e alla sede della lesione. Tra i sintomi più comuni si riscontra intorpidimento e perdita di sensibilità, nonché di funzionalità della regione interessata.

La diagnosi viene effettuata quasi sempre con un accurato esame clinico, che si completa attraverso l'esame elettromiografico, permettendo di misurare la velocità di conduzione di uno stimolo elettrico lungo il nervo interessato.

Dalla letteratura si evince che la riparazione di una lesione nervosa periferica è possibile solo nel caso in cui le fibre a monte della sede danneggiata possano rigenerarsi lungo il moncone distale raggiungendo il loro target. Tuttavia, nel caso in cui vi sia una perdita di sostanza nervosa e la neurorrafia termino-terminale non sia possibile, risulta necessario ricorrere a strategie alternative. Per questo motivo risulta fondamentale poter distinguere le lesioni che interessano i nervi periferici in due categorie principali:

- Lesione aperta: si definisce aperta la lesione causata da ferite da taglio; a sua volta la lesione aperta può essere parziale o completa; entrambe sono particolarmente pericolose a causa del rischio di infezioni dovuto alla interruzione di continuità della pelle;
- Lesione chiusa: si definisce tale quando la stessa è causata da un trauma fisico che porta allo stiramento e/o strappamento dei nervi; viene spesso associata a fratture o lussazioni.

Ad oggi la tecnica *gold standard* utilizzata per il trattamento delle grosse perdite di sostanza nervosa rimane l'innesto nervoso autologo. In tale ambito, valida alternativa risulta l'ingegneria tissutale, quale pratica della medicina rigenerativa, che permette la rigenerazione nervosa progettando *scaffold* (supporti bi/tridimensionali) con strutturazione superficiale di dimensioni subcellulari (nell'ordine dei micrometri e dei nanometri), in grado di riprodurre artificialmente la struttura e le caratteristiche della matrice extra-cellulare in modo da supportare e far crescere gli assoni rigeneranti per brevi distanze, riproducendo le risposte cellulari agli stimoli fisici e chimici provenienti dall'ambiente extracellulare.

Obiettivo di questa ricerca è valutare l'efficienza delle neuroguide, analizzando lo stato dell'arte nel campo della rigenerazione dei nervi periferici, materiali, *design* e tecniche innovative, confrontando tale opzione con la tecnica *gold standard* dell'innesto nervoso autologo, valutando anche i dati clinici presenti nella letteratura.

Capitolo I

Anatomia funzionale del sistema nervoso

Il sistema nervoso, così come presentato in introduzione, è formato dal cervello, dal midollo spinale, dagli organi di senso e da tutti i nervi che mettono in comunicazione questi organi con il resto del corpo.

Si suddivide in due strutture principali: il sistema nervoso centrale (SNC), composta da encefalo e midollo spinale, e sistema nervoso periferico (SNP) composto dai gangli e dai nervi, ciascuno dotato di una funzione specifica. Dal punto di vista funzionale il SNP viene suddiviso in sensoriale (vie afferenti) e motorio (vie efferenti); ciascuna di queste porzioni può essere ulteriormente suddivisa in sistema nervoso autonomo (gestisce le funzioni inconscie dell'organismo) e sistema nervoso somatico (gestisce le comunicazioni con tessuto osseo, muscolare e con le strutture ghiandolari).

Le caratteristiche peculiari di queste strutture sono l'irritabilità, ossia la capacità di trasformare gli stimoli provenienti dall'ambiente esterno in impulsi nervosi, e la conducibilità, la capacità di trasmettere i segnali nervosi ad altre parti della stessa cellula, così come ad altri neuroni ed a cellule effettrici.

Il sistema nervoso è essenziale in quanto mette in comunicazione le diverse parti dell'organismo coordinando le funzioni volontarie e involontarie. Il cervello e il midollo spinale, in particolare, elaborano le informazioni provenienti dagli altri organi e dall'ambiente esterno attraverso le vie afferenti e pianificano opportune reazioni. Per questo motivo le lesioni del sistema nervoso, che portano alla interruzione della conduzione dei segnali e quindi della comunicazione delle parti del nostro corpo tra loro, possono portare a deficit di rilevante gravità.

L'obiettivo di questo elaborato è quello di individuare il modo migliore e più efficace di restituire la continuità tissutale persa; per fare ciò è necessaria una analisi preliminare dell'anatomia e fisiologia delle componenti del SNP e delle lesioni che può subire.

1.1 Cellule del sistema nervoso

Il tessuto nervoso è formato da numerosissime cellule specializzate, chiamate neuroni, che comunicano tra loro attraverso connessioni finalizzate al trasporto di impulsi nervosi.

Queste cellule presentano una morfologia caratteristica che permette di costruire una rete continua tra di esse mediante i prolungamenti neuronali, attraverso i quali vengono trasmessi

segnali di irritabilità e di funzione trofica. Per adempiere a questo compito ciascun neurone è costituito principalmente da un corpo cellulare dal quale dipartono numerosi, lunghi e caratteristici prolungamenti che, a sua volta si distinguono, in base alla forma e alla funzione, in dendriti, che fungono da recettori, e assoni che fungono da effettori.

A seconda della regione in cui si trova, e della funzione che deve svolgere, il neurone può presentare caratteristiche morfologiche diverse; può inoltre essere classificato in base alla conformazione dell'assone, in neurone unipolare, bipolare, pseudounipolare e multipolare.

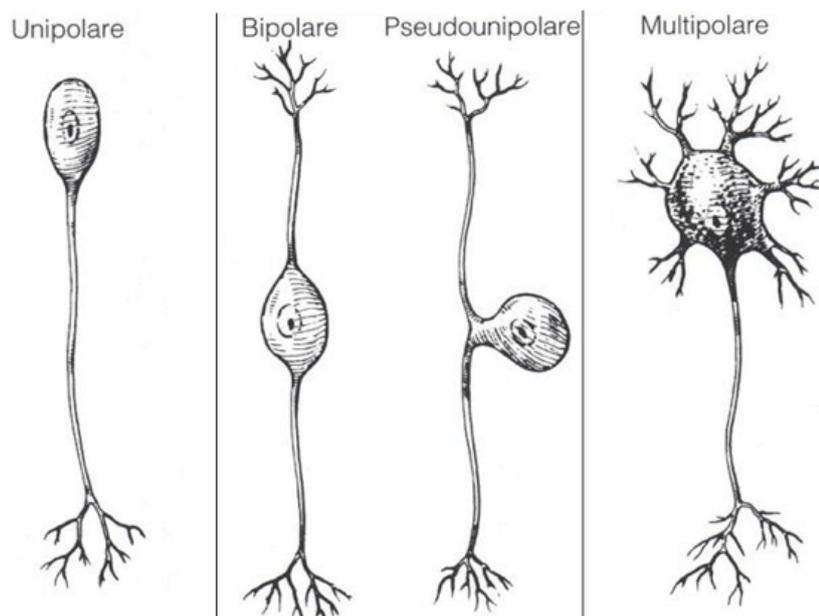


Figura 1: Rappresentazione delle diverse conformazioni neuronali

Il tessuto nervoso è formato da una fitta rete di intrecci di neuroni il cui corpo è localizzato nel cervello, o nel midollo spinale, mentre i prolungamenti, detti assoni, sono diretti verso i gangli, tramite i quali entrano in contatto con il corpo di altri neuroni. Questi ultimi sono dotati di prolungamenti che si dirigono verso l'organo con cui deve essere connesso il sistema nervoso centrale. Questa particolare organizzazione permette di distinguere fibre nervose pregangliari, formate dai prolungamenti dei neuroni il cui corpo è localizzato nel sistema nervoso centrale, e fibre nervose postgangliari, i cui corpi cellulari sono localizzati nei gangli.

Caratteristica fondamentale, per l'adempimento della loro funzione, è che i neuroni sono cellule estremamente polarizzate, capaci di propagare lo stimolo dal corpo verso l'assone e di mettersi in comunicazione con le cellule attraverso delle giunzioni sinaptiche realizzate a livello dei

dendriti. Il sistema nervoso è composto anche da vasi sanguigni, da tessuto connettivo di sostegno e cellule di neuroglia, o cellule gliali e dal tessuto osseo con funzione di protezione.

I neuroni possono essere quindi schematizzati secondo le loro componenti funzionali:

- Corpo cellulare (pirenoforo): contiene il nucleo e il citoplasma;
- Assone o prolungamento nervoso: organizzato in fasci ascendenti (sensoriali) e discendenti (effettori) e formato da cellule di neuroglia e da una guaina mielinica, che è presente in tutti i neuroni solitamente come un unico prolungamento molto lungo e sottile, ha la funzione di trasmettere gli impulsi in zone distanti dal corpo cellulare;
- Dendriti o prolungamenti protoplasmatici: hanno la funzione di ricevere gli stimoli provenienti dall'ambiente esterno o da altri neuroni, di condurli verso il corpo cellulare e di trasformarli in impulsi nervosi (conduzione centripeta o cellulipeta). Sono più corti dell'assone e sono generalmente multipli; hanno molte ramificazioni ed emergono da punti diversi del corpo cellulare. Dal punto di vista morfologico e funzionale sono delle espansioni del corpo cellulare finalizzate a rendere più ampia possibile la superficie disponibile per i contatti sinaptici.

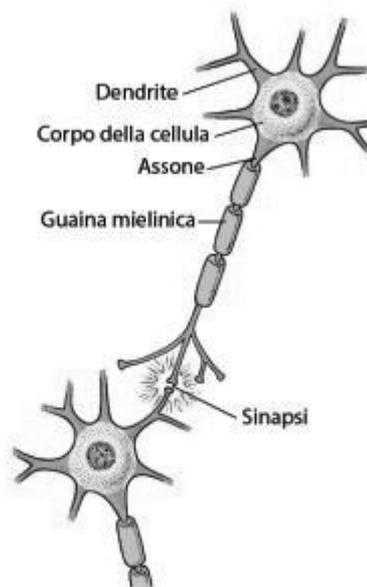


Figura 2: Struttura del neurone

La trasmissione degli impulsi da un neurone all'altro avviene a livello delle sinapsi, strutture specializzate che collegano funzionalmente le cellule del tessuto nervoso tra loro con le cellule degli organi effettori; nella zona sinaptica il segnale nervoso, rappresentato dalla propagazione di un segnale elettrico attraverso la depolarizzazione della membrana, viene convertito in un

segnale chimico che, attraversando lo spazio intersinaptico, conduce l'informazione al dendrito postsinaptico per essere poi riconvertito in un segnale elettrico.

1.2 Sistema nervoso periferico

La funzione principale del sistema nervoso periferico è quella di connettere il sistema nervoso centrale al resto dell'organismo, attraverso l'insieme delle fibre nervose e dei gangli (raggruppamenti dei corpi cellulari dei neuroni) del sistema nervoso somatico, in modo da permettere al sistema nervoso centrale di percepire le informazioni sensoriali, di controllare i movimenti volontari, nonché raccogliere informazioni dagli organi di senso e del sistema nervoso autonomo o vegetativo che controlla i muscoli lisci degli organi interni, i visceri e le ghiandole.

Dal punto di vista funzionale il sistema nervoso periferico può invece essere diviso in più vie che possono occuparsi di portare le informazioni dalla pelle, dai muscoli o dagli organi di senso verso il sistema nervoso centrale; di controllare i muscoli trasmettendo loro le informazioni provenienti dal sistema nervoso centrale; di connettere il cervello e il midollo spinale alla periferia del corpo o di mettere in connessione gli organi interni con il sistema nervoso centrale.

Il sistema nervoso somatico è caratterizzato da fibre nervose, che inviano informazioni sensoriali dalle zone periferiche verso il SNC, e da fibre nervose motorie, che dal sistema nervoso centrale si dirigono verso i muscoli scheletrici. Queste sono formate dai prolungamenti dei motoneuroni, o neuroni efferenti, localizzati nel cervello o nel midollo spinale; le fibre dei neuroni sensitivi, o afferenti, partono invece da neuroni localizzati a livello dei gangli e elaborano le informazioni provenienti dal recettore sensoriale.

Il sistema nervoso autonomo è a sua volta diviso in tre parti: il sistema nervoso simpatico, anche detto cranio-sacrale, il sistema nervoso parasimpatico, o toraco-lombare e il sistema nervoso enterico. La sua organizzazione è più complessa rispetto a quella del sistema nervoso somatico e include la presenza di gangli, fibre pregangliari e fibre post gangliari. I primi sono formati dai prolungamenti di neuroni i cui corpi sono localizzati nel sistema nervoso centrale, nel cervello o nel midollo spinale; queste fibre sono dirette verso i gangli, dove entrano in comunicazione con il corpo di neuroni da cui partono i prolungamenti che formano le fibre postgangliari che si dirigono verso l'organo bersaglio. Sistema nervoso simpatico e parasimpatico agiscono in senso opposto sui diversi organi, bilanciandone le funzioni; mentre il sistema simpatico favorisce l'eccitazione e l'attività fisica il sistema parasimpatico stimola il rilassamento, il riposo, la

digestione e l'immagazzinamento di energia. Il sistema nervoso enterico è invece formato da una fitta rete di fibre che innervano i visceri: il tratto gastrointestinale, il pancreas e la cistifellea. Contrariamente al SNC, il SNP non possiede strutture protettive come lo scheletro o la barriera ematoencefalica. Per questo motivo è esposto ai pericoli associati a traumi meccanici e all'esposizione a sostanze tossiche.

1.2.1 Struttura dei nervi periferici

I nervi sono importanti strutture del sistema nervoso periferico, risultanti dal raggruppamento di più assoni, che hanno l'importante compito di trasportare gli impulsi nervosi dal sistema nervoso centrale alla periferia, e viceversa.

Nel corpo umano sono presenti in totale 43 paia di nervi: 12 paia identificati come nervi cranici che hanno origine nell'encefalo e innervano la testa e il collo e 31 come nervi spinali i quali, originano nel midollo spinale, e innervano tutte le parti del corpo non innervate dai nervi cranici.

In base al tipo di assoni che li caratterizza, i nervi possono ricoprire tre funzioni: una funzione sensitiva, una funzione motoria e una funzione mista. I nervi con funzione sensitiva trasmettono gli impulsi nervosi dai distretti anatomici periferici, ad esempio dai recettori cutanei, al sistema nervoso centrale; i nervi con funzione motoria conducono gli impulsi nervosi dal sistema nervoso centrale ai muscoli scheletrici e alle ghiandole; infine, i nervi con funzione mista hanno la doppia capacità di agire sia come nervi con funzione motoria sia come nervi con funzione sensitiva. Le loro componenti principali sono gli assoni, le cellule di Schwann che formano la guaina mielinica e le strutture di rivestimento con funzione protettiva e nutritiva. I fasci degli assoni formano il nervo e risultano organizzati come strutture complessate tra loro secondo una gerarchia specifica; è possibile, infatti, individuare una struttura ripetitiva formata da:

- Funicoli: complessi di assoni;
- Fascicoli: complessi di funicoli.

Nei nervi sono generalmente riconoscibili tre tipi di rivestimenti con scopo protettivo:

- L'epinervio: è il rivestimento più esterno. Si tratta di un tessuto connettivo costituito da una guaina di tessuto fibrocollageneo lasso alquanto resistente. Ha il compito di proteggere i nervi e le sue componenti interne dalle sollecitazioni di trazione e compressione esterne. Nei tratti più esposti a sollecitazioni esterne i nervi presentano un

epinervio più spesso. Contiene numerosi fascicoli nervosi legati assieme, all'interno dei quali si trovano gli assoni mielinizzati dalle cellule di Schwann.

- Il perinervio è il rivestimento dei fascicoli. Si tratta di un tessuto connettivo caratterizzato da diversi strati di collagene; tali strati gli conferiscono resistenza e robustezza. Oltre a svolgere un'azione protettiva, il perinervio ha il compito di favorire gli scambi tra fascicoli definiti scambi interfascicolari.

- L'endonervio è il rivestimento dei funicoli. Si tratta di un tessuto connettivo lasso, ricco di fibre di collagene. Svolge un'azione protettiva e un'azione rigenerativa delle componenti danneggiate.

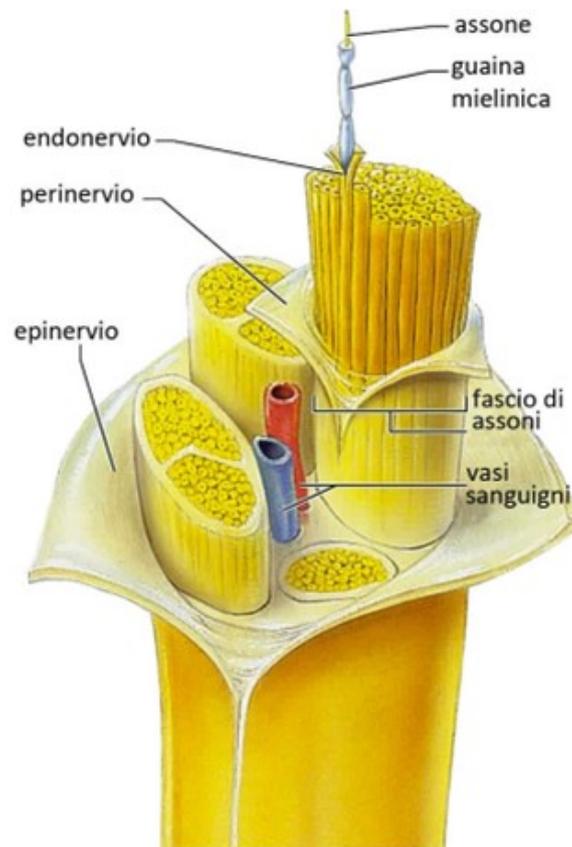


Figura 3: Rappresentazione schematica della struttura di un nervo periferico

Numerosi vasi sanguigni, sia venosi che arteriosi, scorrono all'interno dei nervi; hanno una funzione trofica e di trasporto d'ossigeno alle strutture nervose.

Le cellule di Schwann, appartenenti alla categoria delle cellule della glia, sono fondamentali per il trasporto delle informazioni in quanto producono la mielina, una sostanza con proprietà

isolanti che permette di aumentare la velocità di conduzione del segnale nervoso. Tale sostanza si avvolge ripetutamente attorno all'assone, formando una guaina. Questa guaina mielinica però non è una struttura continua per tutta la lunghezza dell'assone ma presenta delle interruzioni che prendono il nome di nodi di Ranvier. I nodi sono rappresentati da spazi non mielinizzati, che si susseguono lungo gli assoni mielinici, permettendo all'impulso nervoso di compiere dei veri e propri salti da una porzione di mielina all'altra; da ciò deriva la definizione della propagazione dell'impulso nervoso come conduzione saltatoria. Se gli assoni mielinici fossero privi dei nodi di Ranvier, l'impulso nervoso viaggierebbe più lentamente e ci sarebbero ritardi nelle risposte a determinati input o stimoli.

1.2.2 Lesioni dei nervi periferici

Le lesioni nervose periferiche possono interessare tutte le componenti del nervo, nello specifico le fibre nervose, le cellule di Schwann, il tessuto connettivo ed i vasi causando, come effetto principale, l'interruzione della conduzione degli impulsi nervosi.

Le lesioni dei nervi periferici rappresentano un problema clinico molto diffuso e influiscono profondamente sulla qualità della vita dei pazienti. L'incidenza di queste lesioni in Europa è di 300.000 casi all'anno; le cause più frequenti sono incidenti con veicoli a motore, lacerazioni provocate da oggetti affilati e fratture delle ossa lunghe.

A differenza del SNC però nel SNP gli assoni lesionati mantengono la capacità di rigenerarsi spontaneamente a seguito di lesioni nervose anche nell'adulto; la gravità e le conseguenze delle neuropatie indotte da lesioni dei nervi periferici sono quindi generalmente flessibili e variano dal tipo di lesione.

I pazienti che subiscono lievi lesioni dei nervi periferici presentano una favorevole probabilità di autonoma guarigione, mentre i pazienti con gravi lesioni soffrono spesso di disfunzioni nervose motorie, sensoriali e autonome e necessitano di complessi interventi chirurgici di riparazione dei nervi periferici.

Considerando queste variabili una classificazione delle lesioni dei nervi periferici risulta fondamentale nella prognosi e nella determinazione della strategia di trattamento.

Herbert Seddon nel 1943 identificò una classificazione delle lesioni nervose secondo classi di severità del danno neurologico:

- Neuroprassia (Classe I): Rappresenta il grado più basso di lesione nervosa nella quale il nervo rimane intatto e si verifica un'interruzione temporanea della conduzione senza perdita di continuità assonale; è associata ad un blocco fisiologico della conduzione nervosa negli assoni colpiti. La conduzione del segnale nervoso rimane intatta nel segmento distale e prossimale, ma non si verifica conduzione nell'area della lesione. Il recupero del deficit di conduzione nervosa è completo e può richiedere giorni o settimane.
- Assonotmesi (Classe II): Il grado nel quale è possibile osservare perdita della continuità assonica e della copertura mielinica ma viene preservata la struttura del tessuto connettivo del nervo (epinevrio e il perineurio). Provoca deficit sensoriali e motori distali rispetto al sito della lesione e risulta assente la conduzione nervosa distale al sito della lesione; la rigenerazione assonale, e il relativo recupero, può essere possibile senza trattamento chirurgico. Può risultare necessario un intervento chirurgico in presenza di formazione di tessuto cicatriziale.
- Neurotmesi (Classe III): Ultimo grado della classificazione, il più grave. Rappresenta una condizione nella quale vi è una rottura totale, o un'interruzione dell'intera fibra nervosa; sia l'assone che il tessuto connettivo sono danneggiati. È caratterizzato da un danno nel quale è presente una lesione del tessuto connettivo che può essere parziale o completo; i deficit senso-motori e il difetto della funzione autonoma sono gravi e non c'è conduzione nervosa distale al sito della lesione.

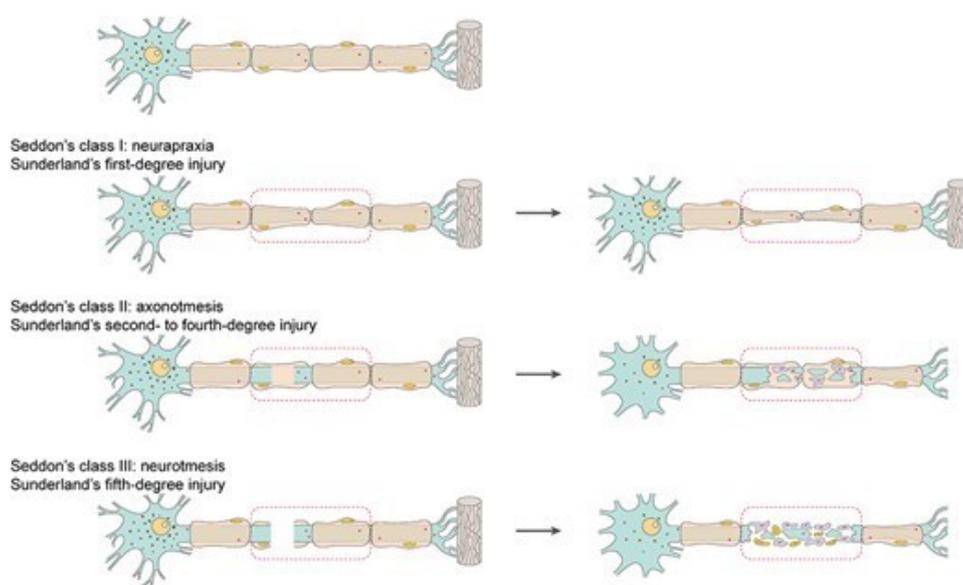


Figura 4: Rappresentazione della classificazione di Seddon per le lesioni nervose

Successivamente, nel 1951, Sydney Sunderland ha ampliato la classificazione di Seddon riconoscendo cinque gradi di lesione dei nervi periferici, suddividendo la classe neurotmesi in tre classi:

- Primo grado (Classe I): La neuroaprassia, coincide con il primo grado di Seddon.
- Secondo grado (Classe II): L'assonotmesi, coincide con il secondo grado di Seddon.
- Terzo grado (Classe III): è incluso nella Neurotmesi di Seddon. Secondo Sunderland però il terzo grado presenta un'interruzione delle fibre nervose nella quale è presente una lesione dell'endoneurio, ma l'epinevrio e il perinevrio rimangono intatti. Il recupero da una lesione di questo tipo è possibile, ma potrebbe essere richiesto intervento chirurgico.
- Quarto grado (Classe III): è incluso nella neurotmesi di Seddon. Nella lesione di quarto grado di Sunderland solo l'epineurio rimane intatto. In questo caso, è necessaria una riparazione chirurgica.
- Quinto grado (Classe III): è incluso nella Neurotmesi di Seddon. La lesione di quinto grado è una recisione completa del nervo; la guarigione non è possibile senza un adeguato trattamento chirurgico.

Successivamente, Mackinnon e Dellon (1988), hanno modificato la classificazione di Sunderland aggiungendo una lesione di VI grado; questa si verifica nel caso di una lesione mista dove coesistono diversi tipi di lesione dello stesso tronco nervoso.

In generale la condizione risultante da un deterioramento e/o da un cattivo funzionamento dei nervi periferici viene identificata con il termine neuropatia periferica. Le neuropatie periferiche si possono inoltre dividere in mononeuropatie, multineuropatie e polineuropatie. Per mononeuropatia si intende il danno focalizzato ad un singolo tronco nervoso (ferite, agenti tossici, compressione, ecc.). Con multineuropatia si intende l'interessamento multifocale, simultaneo o in tempi successivi, di più nervi periferici non contigui dovuto a malattie infettive, infiammatorie sistemiche o metaboliche come ad esempio il diabete. Con polineuropatia, si intende il deficit bilaterale e simmetrico di nervi periferici.

Capitolo II

Ingegneria tissutale

L'ingegneria tissutale, o ingegneria dei tessuti, è definita come una tecnica interdisciplinare che applica i principi e i metodi dell'ingegneria e delle scienze biologiche al fine di comprendere le relazioni fondamentali tra struttura e funzione, sia nei tessuti sani che malati dei mammiferi e di sviluppare sostituti biologici, come tessuti o organi, in grado di ripristinare, mantenere o migliorarne le funzioni.

Lo scopo è quello di utilizzare cellule viventi, materiali biocompatibili e fattori biochimici per costruire sostituti biologici in grado di imitare i tessuti per scopi diagnostici o di ricerca e sostituire, o aiutare a rigenerare, i tessuti malati o feriti.

Nella maggior parte dei casi l'obiettivo finale è l'impianto di questi costrutti tissutali nell'organismo al fine di riparare una lesione o sostituire la funzione di un organo malato. Il termine medicina rigenerativa è spesso usato come sinonimo di ingegneria tissutale, sebbene la medicina rigenerativa spesso implichi l'uso di cellule staminali come fonte cellulare.

Ulteriore sviluppo legato a questa disciplina è stata l'incorporazione di nuove tecnologie basate sui progressi della biologia molecolare e cellulare e dell'ingegneria dei micro e nanosistemi, come ad esempio la microfabbricazione e stampa 3D.

2.1 Principi dell'ingegneria tissutale

L'obiettivo principale di questa disciplina è di ottenere la ricostruzione del tessuto e la restituzione della sua funzionalità, attraverso l'utilizzo di prototipi e prodotti terapeutici, analizzando in particolare le caratteristiche e le proprietà dei tessuti soggetti a lesioni, a malattie e a degenerazione.

Gli elementi fondamentali sui quali vertono gli studi dell'ingegneria tissutale risultano quindi tre: le cellule, i biomateriali e le biomolecole. Associando le conoscenze di questi tre elementi ci si pone l'obiettivo di sviluppare scaffold adeguati dal punto di vista biochimico e meccanico.

Le cellule derivano principalmente da un tessuto di un donatore e sono spesso in quantità molto limitata. In alternativa vengono utilizzate cellule staminali o progenitrici. Le cellule staminali possiedono due proprietà principali interessanti per questo settore ossia l'elevata capacità proliferativa e la pluripotenza, la capacità di differenziarsi in cellule di più lignaggi.

Le limitazioni etiche all'uso delle cellule staminali embrionali umane sono un ostacolo significativo per l'utilizzo in ambito industriale, ma i recenti progressi raggiunti nell'uso di cellule staminali adulte, cellule staminali pluripotenti indotte e cellule staminali da fonti placentari e ombelicali, hanno permesso una maggiore sperimentazione.

Esigenza fondamentale per un efficace risultato è valutare correttamente l'ambiente cellulare, in modo da consentire alle cellule di proliferare e adempiere alle proprie funzioni come avviene nel tessuto nativo.

È quindi d'obbligo una adeguata valutazione e selezione dei biomateriali utilizzati in ingegneria tissutale per prevenire un effetto tossico sulle cellule circostanti e sull'intero organismo.

In questo ambito trovano largo spettro di utilizzo materiali naturali a base di proteine, come il collagene e la fibrina, di polisaccaridi, come il chitosano, i glicosamminoglicani e l'acido ialuronico. Sebbene la biocompatibilità con i materiali naturali sia eccellente, in alcuni casi permangono problemi causati dalla non adeguata biodegradabilità di questi materiali. Per questo motivo vengono spesso affiancati da altri materiali.

Si è recentemente sviluppato un importante interesse nell'uso di matrici di tessuto decellularizzato, ottenute dall'elaborazione del tessuto donatore, e nell'utilizzo di costrutti di ingegneria tissutale trattati con l'utilizzo di stimoli chimici e meccanici esogeni come fattori di crescita e differenziazione solubili, come proteine morfogenetiche ossee (BMP) e il fattore di crescita trasformante- β (TGF- β).

Una delle principali funzioni non strutturali della matrice extracellulare (ECM) naturale *in vivo* è quella di legare, trattenere e presentare fattori di crescita che, attraverso una erogazione controllata, possono essere utilizzati anche per aumentare la longevità del carico del fattore solubile originale.

L'ingegneria tissutale si focalizza nel creare nuovi tessuti e terapie seguendo i requisiti fondamentali necessari per tessuti e organi complessi:

- scalabilità a una dimensione clinicamente rilevante, che può richiedere la fornitura di un più ampio sistema di trasporto/vascolare;
- controllo rigoroso sui materiali di partenza (ad esempio la fonte cellulare e il materiale dello *scaffold*), e sul protocollo di produzione per garantire l'affidabilità;
- capacità di tollerare, e persino facilitare, il processo di integrazione con l'ospite, che può comportare, ad esempio, la modulazione della risposta immunitaria locale, l'uso di

un regime di preconditionamento che allevia lo *shock* metabolico del passaggio dal mezzo di coltura al plasma, o la stimolazione dell'angiogenesi.

2.2 *Biomolecole*

L'integrazione corretta e funzionale di un biomateriale nell'organismo dipende dalle corrette interazioni con il tessuto e con le cellule circostanti, oltre ovviamente a fattori intrinseci del materiale stesso.

Per questo motivo per migliorarne l'integrazione si è cominciato a utilizzare materiali che esprimono biomolecole, fattori chimici e fisici, rappresentati da fattori di angiogenesi che promuovono nuove fasi, fattori di crescita e fattori di differenziamento.

Allo stesso modo vengono utilizzate proteine che stimolano l'attività delle cellule, ad esempio le proteine di segnalazione, che in natura vengono prodotte dall'organismo e, generalmente, sono conservate all'interno della matrice allo scopo di fornire alle cellule informazioni specifiche.

Queste proteine possono essere depositate sulla superficie dello scaffold in modo da interagire con i recettori cellulari quando le cellule cominciano ad entrare a contatto con lo scaffold. In questa circostanza lo scaffold diviene biomimetico, essendo arricchito con proteine segnale in grado di informare le cellule sulle funzioni da svolgere.

2.3 *Biomimetica*

Nei tessuti naturali le cellule sono immerse in una matrice extracellulare caratterizzata da una struttura di nanofibre naturali gerarchicamente organizzate a formare un *network* polimerico finalizzato a sostenere l'intera architettura cellulare, determinando la morfologia del tessuto.

La corretta interazione che si genera tra le nanofibre e le cellule permette alla matrice extracellulare di influire sul comportamento delle cellule, nella proliferazione, differenziazione e migrazione attraverso stimoli biomeccanici, così come sul legame con fattori di crescita, sulle interazioni con i recettori superficiali delle cellule, ma anche sulle proprietà meccaniche come resistenza a compressione e a trazione, elasticità dei diversi tessuti e organi.

La matrice extracellulare naturale è composta da tre classi di biomolecole:

- proteine fibrose strutturali come collagene fibrillare, in particolare del tipo I, II e III, ed elastina; il collagene impartisce integrità strutturale e resistenza ai tessuti, mentre l'elastina ne aumenta le proprietà elastiche;
- proteoglicani, molecole proteiche che si formano dall'unione di glicosamminoglicani (GAGs: polisaccaridi a catena non ramificata) con proteine dell'ECM; permettono di legare e immagazzinare i fattori di crescita all'interno dell'ECM;
- polisaccaridi: un esempio è l'acido ialuronico che impartisce resistenza a compressione ai tessuti grazie alla sua capacità di rigonfiarsi in presenza di acqua.

Nell'ambito della rigenerazione tissutale si ricorre spesso all'utilizzo di scaffold, strutture artificiali in grado di imitare le caratteristiche della ECM naturale del tessuto che si è interessati a riprodurre. Essendo i costituenti della ECM di dimensione nanometrica (il diametro delle proteine strutturali è compreso tra i 50 e i 500 nm) le nanotecnologie rivestono un ruolo centrale nella produzione di *scaffold*.

Il successo nella rigenerazione dei tessuti dipende dalla capacità di produrre e ingegnerizzare materiali biomimetici che simulino la complessità e le funzionalità della ECM ricreando un ambiente che supporti e regoli le funzioni cellulari necessarie alla sintesi dei diversi tessuti.

Ciascun tessuto è caratterizzato da una ECM avente composizione, struttura e proprietà biochimiche e meccaniche differenti, risulta dunque necessaria la realizzazione di *scaffold* appositamente studiati per ciascun specifico tessuto. Lo *scaffold* deve essere biocompatibile, avere un tempo di degradazione adatto al suo utilizzo e possedere la corretta porosità e interconnettività in modo da interagire in maniera ottimale con le cellule del tessuto.

2.4 Cellule utilizzate nell'ingegneria tissutale

Solitamente nel campo dell'ingegneria tissutale si utilizzano cellule derivate da tessuto donatore o cellule staminali o progenitrici, quindi si parla sia di cellule staminali embrionali o adulte, sia di cellule somatiche già differenziate.

Per questo scopo vengono selezionate cellule autologhe, allogene, xenogene, staminali, nonché quelle geneticamente modificate che vengono manipolate dal punto di vista immunitario in quanto devono venire tollerate dal sistema ricevente.

Le cellule staminali godono di tre principali proprietà che le hanno rese un pilastro nello studio della rigenerazione dei tessuti:

- La capacità proliferativa;
- La capacità di auto replicarsi nel loro stato indifferenziato;
- La pluripotenza o capacità di differenziarsi in cellule di più linee e quindi in tipi cellulari ben specifici.

2.4.1 *Cellule staminali*

Le cellule staminali vengono spesso utilizzate in ingegneria tissutale per la loro capacità di differenziarsi in cellule specializzate e per mantenere il naturale *turnover* rigenerativo di organi come sangue, cute o intestino.

I vantaggi che possiamo osservare nell'utilizzo di cellule staminali sono l'abbondante disponibilità, la loro plasticità sia *in vivo* che *in vitro*, che permette di ottenere il tipo cellulare desiderato e più adatto al nostro organismo, e il basso potenziale immunogenico.

L'effetto collaterale che si può riscontrare nell'utilizzo delle cellule staminali, e che bisogna tenere attentamente in considerazione, è la possibile proliferazione e differenziamento incontrollato qualora non vengano garantite le condizioni ottimali *in vitro* e nella coltura.

Nel capitolo 5. si riporta una valutazione sulle cellule staminali e sulle loro caratteristiche, analizzando studi clinici presenti in letteratura, indagandone la natura e le proprietà.

2.4.2 *Cellule differenziate somatiche*

Le cellule differenziate, o somatiche, sono cellule specializzate nello svolgimento di determinate funzioni, con caratteristiche morfologiche ben definite e presentano la capacità di generare soltanto cellule dello stesso tipo.

Al contrario delle cellule staminali, bisogna porre rigorosa attenzione nel loro utilizzo *in vivo* al fine di prevenire una eccessiva risposta immunitaria incontrollata, analizzando opportunamente il sito di innesto, tenendo in considerazione la loro limitata capacità di replicazione.

L'aspetto più vantaggioso dell'utilizzo delle cellule differenziate è la capacità di controllarne la proliferazione ed il differenziamento *in vitro* e dalla non immunogenicità, oltre all'assenza di implicazioni di ordine etico-normativo che limitano l'utilizzo delle cellule staminali.

2.5 *Biomateriali*

Lo studio dei biomateriali ha portato ad una loro classificazione in base alla natura chimica (polimerici, metallici, ceramici, compositi e di derivazione biologica), agli effetti prodotti dall'ambiente biologico sugli stessi materiali (biostabili, biodegradabili) ed in base agli effetti prodotti sull'organismo (bioinerti, biotossici, bioattivi, biorassorbibili).

Tale classificazione assume particolare importanza in ambito medico secondo la reazione che provocano una volta che vengono inseriti nell'organismo vivente:

- **Materiali bioinerti:** sono materiali che presentano un'interfaccia stabile con l'ambiente biologico, ossia i costituenti del tessuto e quelli del materiale non reagiscono chimicamente tra di loro; questi materiali sono in grado di convivere con l'ambiente biologico senza causare particolari reazioni avverse.
- **Materiali bioincompatibili:** sono materiali che provocano una instabilità all'interfaccia con il tessuto biologico provocando reazioni di irritazione, infiammazione, danno generico, immunogenità, patogenità, tossicità, mutagenicità e carcinogenicità.
- **Materiali biotossici:** si tratta di materiali che provocano una reazione indesiderata da parte del tessuto biologico, soprattutto a seguito di processi di tipo chimico e/o galvanico.
- **Materiali bioattivi:** questi materiali provocano una reazione da parte dell'ospite, ovvero il loro impianto induce nell'organismo una specifica attività biologica, permettendo la formazione di interazioni dirette con il tessuto biologico al quale è consentita la crescita sulla superficie del materiale.
- **Materiali biorassorbibili:** sono biomateriali che, all'interno del sistema biologico, subiscono una progressiva degradazione senza che questa provochi reazioni indesiderate o effetti tossici.

Risulta dunque importante valutare bene le specifiche del materiale quando si va ad innestarlo all'interno di un sistema biologico, in quanto un corpo estraneo produce una cascata di eventi in base alle condizioni presenti sull'interfaccia tra il materiale, il dispositivo e l'ambiente biologico che, se non adatto allo scopo o al sito d'innesto, produce un danno a carico dei tessuti a cui, inevitabilmente, segue una reazione di coagulazione ed infiammazione.

2.5.1 *Biocompatibilità*

Per valutare e ridurre il rischio di eventi inattesi ed indesiderati, occorre conoscere la biocompatibilità sia del dispositivo nella sua integrità sia dei singoli materiali di cui è composto, tenendo conto anche delle funzioni che il materiale stesso dovrà svolgere *in vivo*.

La biocompatibilità è un termine che sottolinea la capacità di essere compatibile con un organismo vivente senza recare effetti dannosi e senza limitarne le funzioni vitali. Nella letteratura di carattere medico più specificamente serve a definire la particolare proprietà di sostanze, organi o materiali, di essere ben tollerati da un organismo vivente e comprende l'idea dell'accettazione di un impianto artificiale da parte dei tessuti circostanti e da parte dell'organismo.

Le proprietà fondamentali che un biomateriale deve possedere per poter essere biocompatibile sono:

- La non tossicità nei confronti dell'organismo, ossia il permanere in situ senza causare effetti citotossici;
- Una adeguata funzionalità sia del materiale che del dispositivo, deve possedere caratteristiche meccaniche, fisiche e chimiche adeguate a svolgere una determinata funzione.

2.5.2 *Biodegradazione*

La biodegradabilità è la capacità di sostanze e materiali organici di degradarsi in sostanze più semplici mediante l'attività enzimatica. Al completamento di questo processo si osserva una completa conversione delle sostanze organiche originali in molecole inorganiche semplici quali acqua, metano e anidride carbonica.

Il requisito fondamentale per questi materiali è di essere in grado di riassorbirsi autonomamente man mano che il tessuto si rigenera; al termine del processo di sintesi il tessuto deve essere costituito unicamente da materiale biologico, rendendo non necessario un intervento di rimozione dello stesso, il tutto, ovviamente, senza recare danno all'organismo, senza produrre effetti tossici e senza evocare risposta immunitaria e infiammatoria.

2.6 Scaffold

L'ingegneria tissutale permette la progettazione e la formazione di nuovi tessuti al fine di creare sostituti biologici capaci di migliorare, riparare o curare i tessuti presenti all'interno dell'organismo umano. Numerose strategie utilizzate in questo settore dipendono dall'impiego di uno *scaffold* artificiale, ossia un materiale con caratteristiche morfologiche dell'ordine dei nanometri, ingegnerizzato per emulare una matrice extracellulare sintetica in grado di ospitare e organizzare le cellule in una architettura 3D e rilasciare sostanze stimolanti, che dirigono la crescita e la formazione del tessuto desiderato.

Lo *scaffold* deve inoltre essere in grado di far accrescere e diversificare le cellule e deve possedere caratteristiche specifiche a seconda del tessuto da rigenerare: adeguate proprietà meccaniche, porosità e permeabilità per permettere lo sviluppo cellulare.

Gli *scaffold* rappresentano una delle principali risorse dell'ingegneria tissutale in quanto ricreano un ambiente che agevola l'adesione, la migrazione e proliferazione delle cellule, ne guidano il comportamento e veicolano il trasporto di nutrienti; è necessario quindi che influiscano correttamente sulle proprietà biomeccaniche, biochimiche e biologiche del tessuto e delle cellule.

Durante la progettazione di uno *scaffold* è fondamentale valutarne la biocompatibilità e la non tossicità per l'organismo ospitante evitando lo sviluppo di complicanze e favorendo la crescita e la differenziazione delle cellule al suo interno.

Lo *scaffold* deve poi possedere un giusto grado di permeabilità, ovvero una porosità tale che interstizi e pori abbiano un'adeguata dimensione e costituiscano un reticolo percolativo che favorisca la crescita e disposizione cellulare, l'apporto di sostanze nutritive e lo smaltimento dei prodotti metabolici; generalmente, si ritiene che una porosità dell'ordine dell'80-90% garantisca una buona interconnessione, permettendo una rigenerazione tissutale adeguata.

Nel caso di scaffold biorisorbibili, la velocità di degradazione deve essere compatibile con quella di formazione del nuovo tessuto, in modo tale da garantire il corretto sostegno e contemporaneamente la libera crescita del tessuto.

Al fine della biomimesi è fondamentale riuscire ad imprimere al tessuto sintetico proprietà meccaniche simili al tessuto naturale che si vuole sostituire, in modo tale da favorire una corretta interazione con l'ambiente circostante una volta innestato *in vivo* capace di sopportare i carichi e gli stress fisiologici a cui sarà soggetto, evitando l'insorgere di zone di accumulo di *stress* residuo all'interfaccia tra il tessuto sintetico e l'ambiente biologico in modo da evitare

una scorretta degradazione o una rottura accelerata, del innesto artificiale e un danno ai tessuti circostanti.

Presentando caratteristiche morfologiche dell'ordine dei nanometri, l'utilizzo di nanomateriali per la realizzazione di queste strutture è un fattore determinante per il successo dello *scaffold* in quanto permette di ottenere proprietà analoghe a quelle del tessuto naturale che si vuole sostituire, riuscendo ad emulare il più possibile la rete di nanofibre naturali organizzate gerarchicamente caratterizzanti la matrice extracellulare, in modo da garantire la migliore interazione possibile tra impianto e organismo.

Le nanotecnologie risultano inoltre determinanti per la progettazione biomimetica della matrice extracellulare del tessuto al fine di riprodurre le proprietà fisiche della ECM, i segnali chimici prodotti dalle proteine e i peptidi che la costituiscono e la sua topografia su scala nanometrica.

Valutando attentamente la combinazione tra nanostruttura porosa e il rapporto tra area superficiale e volume è possibile favorire l'adesione, la proliferazione, la migrazione e la differenziazione delle cellule ospitate, realizzando una partecipazione attiva al processo di rigenerazione dei tessuti senza stimolare reazioni di rigetto da parte dell'organismo.

Rispettando tutte queste caratteristiche, gli scaffold vengono prodotti generalmente di tre tipi:

- sintetici: hanno il vantaggio di poter essere prodotti con proprietà specifiche, essere stabili e riproducibili dal punto di vista chimico e privi di ogni agente patogeno;
- naturali: sono composti da proteine, zuccheri o altri componenti di tipo naturale derivati da animali o piante. Sono biocompatibili e liberi da agenti patogeni, possono essere modellabili nelle loro caratteristiche, ad esempio modificandone la concentrazione o mediante funzionalizzazione;
- decellularizzati: sono tessuti trattati con sostanze chimiche che permettono la rimozione della porzione cellulare dal tessuto, lasciando integra la componente extracellulare. Sono biocompatibili e preservano la struttura tridimensionale del tessuto con tutti i componenti della ECM.

In origine, molti dei biomateriali sintetici utilizzati erano materiali a base di collagene e della famiglia dei polimeri polilattici, poliglicolici e policaprolattoni che venivano impiegati perché già conosciuti come base delle suture biorisorbibili. Per contro questi materiali si sono dimostrati tutt'altro che ottimali in molte applicazioni dell'ingegneria dei tessuti, in quanto il loro processo di biodegradazione idrolitica rilascia un acido che può risultare tossico per le cellule. Per evitare questi rischi sono stati studiati differenti materiali sintetici con ulteriori

proprietà quali iniettabilità, trasparenza, porosità e cinetica di riassorbimento. Si sono quindi diffusi principalmente gli scaffold naturali, a base di ECM, per i quali vengono utilizzati in particolare proteine come il collagene e la fibrina, elastina, polisaccaridi come i proteoglicani, glicosamminoglicani, alginato ed acido ialuronico e enzimi.

Nella realizzazione dello scaffold possono essere sfruttate anche le proprietà reticolanti della gluteraldeide al fine di rallentare la cinetica di degradazione.

2.6.1 Scaffold neurali

Per riparare le lesioni del sistema nervoso è necessario controllare la crescita e la connettività funzionale delle reti neuronali tridimensionali. Risulta quindi necessario fabbricare *scaffold* basati su nanomateriali con proprietà chimiche, geometriche e meccaniche altamente regolate.

Funzionalizzando il substrato degli *scaffold* con molecole guida a risoluzione nanometrica è possibile guidare e sostenere la crescita e la differenziazione neuronale, fabbricando monostrati di nanofibre gelatinose in grado di sostenere la crescita di astrociti e neuroni ippocampici oltre alla differenziazione delle cellule staminali in prospettiva di neuroni funzionali.

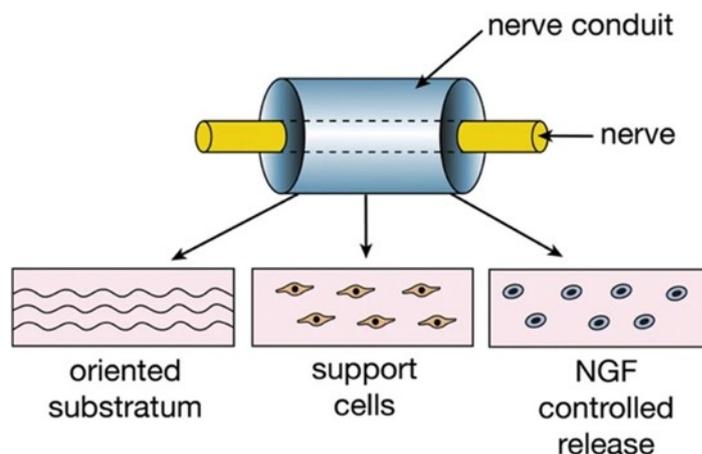


Figura 5: Rappresentazione di uno scaffold neurale funzionalizzato attraverso tecniche morfologiche, cellulari e biologiche

La medicina rigenerativa utilizza spesso *scaffold* di materiali differenti per la riparazione dei tessuti prodotti con una varietà di tecniche differenti, inclusa la prototipazione rapida, un approccio recentemente sviluppato che utilizza la progettazione assistita da computer.

È stata testata la realizzabilità di *scaffold* neuronali utilizzando la stampa 3D con inchiostri contenenti particelle ultrafini. Gli *scaffold* realizzati con nanotubi di carbonio sono stati ulteriormente funzionalizzati attraverso l'infiltrazione di molecole con specifica attività biologica.

Per questi sviluppi sono risultati fondamentali le ricerche effettuate per il progetto NEUROSCAFFOLDS (Rapid prototyping scaffolds for the nervous system), finanziato dall'UE. (<https://cordis.europa.eu/article/id/173629-regenerative-scaffolds-for-the-central-nervous-system/it>)

Dalle analisi svolte in vitro sulle colture dei neuroni è stato scoperto che questi *scaffold* tridimensionali promuovono una morfologia più affine a quella *in vivo*. L'attività funzionale dei neuroni coltivati sfruttando questa tecnica è risultata caratterizzata da una frequenza maggiore; inoltre si è osservata un'ampia rete 3D di collegamenti.

Gli *scaffold* sviluppati sono stati testati anche in vivo in un ratto per ottenere la rigenerazione del nervo sciatico e sono risultati ben tollerati e per un'efficace rigenerazione delle cellule di Schwann e degli assoni.

Capitolo III

Innesti autologhi, il trattamento gold-standard

La riparazione delle piccole lesioni nervose mediante sutura diretta dei monconi recisi, in assenza di tensione, rappresenta il trattamento più utilizzato nelle lesioni dei nervi periferici. La sutura *end-to-end*, o sutura termino-terminale (metodologia di sutura in cui la parte terminale dei due monconi viene unita chirurgicamente) spesso provoca danni sotto forma di reazioni da corpo estraneo e cicatrizzazione della linea di sutura, poiché gli assoni vengono disorganizzati, bloccati o impigliati nei neuromi.

Perdita di sostanza nervosa, ritardo nella riparazione chirurgica e gravi danni concomitanti, possono impedire la riparazione primaria. L'innesto nervoso autologo, detto anche autotrapianto o autoinnesto nervoso, è in questi casi considerato tuttora la tecnica migliore per la riparazione delle lesioni nervose dove risulta necessario colmare le lacune nervose estese, maggiori di 30 mm, tra i monconi dei nervi prossimale e distale e promuovere la rigenerazione del nervo.

La soluzione tradizionale prevede che il neurochirurgo prelevi, da una zona periferica del corpo del paziente stesso, una parte di nervo sano che viene poi riutilizzata per collegare i due tronconi del nervo tranciato e allineare le fibre nervose al fine di colmare il divario del tessuto danneggiato.

L'innesto nervoso autologo è considerato il *gold standard* per la riparazione delle lesioni nervose periferiche in quanto riduce il rischio di rigetto immunologico e stimola un effetto terapeutico positivo fornendo un microambiente tissutale nativo per la rigenerazione del nervo.

Sono stati ottenuti ottimi risultati affiancando all'autotrapianto nervoso un autotrapianto di cellule di Schwann le quali influiscono sulla riparazione assonale e sulla riparazione della mielina migliorando la riparazione nervosa e il recupero di funzionalità, oltre che a garantire la compatibilità con la lamina basale, caratteristica fondamentale per realizzare un microambiente ottimale per la ricrescita nervosa.

Gli autoinnesti nervosi forniscono infatti la sostituzione tissutale ideale, poiché riflettono il tessuto nativo chimicamente, biologicamente e strutturalmente.

Il nervo più comunemente utilizzato in questa metodica è il nervo surale prelevato dalla caviglia esterna posteriore. Altri nervi che possono venire utilizzati come autoinnesti nervosi sono i nervi intercostali, i nervi peronei superficiali e profondi, i nervi cutanei posteriori e laterali della coscia e i nervi cutanei superficiali.

I fattori che influenzano la scelta del nervo più adatto da prelevare sono legati alla posizione del nervo da riparare, alla lunghezza e al diametro del *gap* nervoso ed alla morbidità associata al sito donatore.

L'innesto del nervo autologo ha finora prodotto i migliori risultati rispetto a tutti gli altri metodi di trattamento. L'impiego di autoinnesti nervosi porta vantaggi certi in quanto questi agiscono come *scaffold* immunogenicamente inerti che hanno la capacità di fornire le cellule di Schwann e i fattori neurotrofici appropriati. Nello specifico questo tipo di innesto dà buoni risultati in quanto offre la disponibilità di fattori neurotrofici e neurotropici; inoltre la membrana basale delle cellule di Schwann contiene fattori quali la laminina e la fibronectina, in grado di promuovere la progressione assonale.

L'autotrapianto può presentare però anche numerose criticità:

- può causare danni al sito donatore;
- il prelievo da un sito donatore può essere causa di morbidità del sito donatore con perdita funzionale;
- il nervo donatore è solitamente un nervo sensoriale funzionante che viene utilizzato per riparare un nervo motorio danneggiato, comportando pertanto il sacrificio di un nervo sensitivo con conseguente perdita sensoriale;
- l'uso di autoinnesti nervosi è limitato a lacune nervose con una lunghezza massima di circa 50 mm;
- la percentuale di recupero funzionale dopo la chirurgia risulta, indicativamente, limitata al 50%;

L'utilizzo degli innesti autologhi permette dunque di ottenere buoni risultati nella riparazione del nervo danneggiato, ma presenta numerose controindicazioni per la salute e per il recupero del paziente, in quanto può trovarsi a rischio di una potenziale formazione di un neuroma e di cicatrici nel sito donatore. Il prelievo da un sito donatore, data la necessità di una seconda incisione per raccogliere il tessuto dell'innesto, può essere causa di morbidità del sito donatore stesso e di perdita funzionale, portando all'aumento dei tempi di recupero per il paziente.

Inoltre le due suture, una prossimale ed una distale che fissano l'innesto, potrebbero essere sede di una sfavorevole proliferazione fibroblastica che ostacola la progressione dei sottili assoni rigeneranti. I punti di sutura portano inoltre a cicatrici alla possibile proliferazione fibroplastica

e miofibroblastica che, nel peggiore dei casi, può portare ad una sezione infiammatoria ed infine ad una fibrosi che ostacola la rigenerazione nervosa.

Un'altra criticità presente in questo metodo è rappresentata dalla limitata disponibilità di tessuto autologo in quanto i siti donatori disponibili nell'uomo sono in numero limitato, con conseguente carenza di materiale da innesto.

Alternativa all'autotrapianto è l'allograpianto, il quale prevede di utilizzare il tessuto nervoso di un donatore selezionato e messo a disposizione dalla Banca dei tessuti, in alternativa alla porzione di nervo del paziente stesso.

Il vantaggio è duplice. Innanzitutto il paziente non viene sottoposto a due interventi, uno per prelevare la porzione di nervo sano e uno per ricollocarla e ricongiungere le due parti di nervo danneggiato. In secondo luogo si evita al paziente un deficit permanente, cioè la perdita di sensibilità di quella parte del corpo da cui il nervo sensitivo è stato asportato.

Il risultato del trapianto non cambia, sia che si usi un nervo prelevato dal paziente stesso, sia che si utilizzi un nervo da donatore: una volta che il neurochirurgo ha ricollegato le due parti del nervo che era stato danneggiato, lo spezzone aggiunto costituisce il binario attraverso cui il nervo ricresce, rafforzandosi e consolidandosi e ristabilendo la continuità della conduzione degli impulsi nervosi.

L'innesto di nervo è una tecnica che ottiene ottimi risultati. Presenta però anche una serie di svantaggi legati principalmente alla morbidità del sito donatore e dell'innesto quali infezioni, dolore, cicatrici, neuromi, perdita di sensibilità, nonché nella necessità di un'ulteriore chirurgia che allunga i tempi operatori.

Altro aspetto critico da tenere in considerazione è la biocompatibilità dell'alloinnesto con l'organismo ricevente in quanto, se non valutata correttamente, porta all'attacco dell'innesto dal sistema immunitario, in quanto ritenuto non self e a complicanze postoperatorie.

Il prelievo e la sostituzione di un innesto nervoso possono quindi produrre significative complicazioni e conseguenze sulla vita del paziente, per questo motivo la ricerca si è indirizzata verso tecniche differenti per la rigenerazione dei nervi, in grado di permettere un recupero funzionale e di limitare le controindicazioni e criticità per il paziente.

Capitolo IV

Neuroguide per la rigenerazione neurale

Le lesioni traumatiche del sistema nervoso periferico a carico dei tronchi e/o dei nervi sono fonte di disabilità cronica e la loro riparazione con le tradizionali tecniche chirurgiche ha un limitato successo, in particolare nel caso in cui un segmento di nervo danneggiato deve essere sostituito. Le lesioni dei nervi periferici sono la conseguenza di un danno alle fibre nervose a seguito del quale il nervo muore distalmente con successiva degenerazione assonica. Dal punto di vista chirurgico tali lesioni vengono riparate con innesto autologo, utilizzando nervi donatori sensitivi o guide riassorbibili.

La letteratura scientifica riferisce che il recupero funzionale completo a seguito di tali interventi è raro o associato a dolore neuropatico, soprattutto quando la distanza tra le parti del tessuto lesionato è ampia o quando la lunghezza del nervo che deve rigenerare è importante; il nervo periferico infatti, nelle migliori condizioni possibili, rigenera per circa 1mm/die.

Studi sperimentali hanno dimostrato come l'utilizzo combinato di neuroguide e cellule staminali produca un miglioramento della rigenerazione del nervo periferico senza evidenza istologica di crescita tumorale.

Affinché questa tecnica di rigenerazione neurale sia attuabile è necessaria una approfondita conoscenza dell'anatomia dei nervi e dei loro processi rigenerativi.

Il primo passo del processo rigenerativo consiste nella pulizia della mielina e dei detriti assonali da parte delle cellule di supporto, comprese le cellule di Schwann e i macrofagi.

Successivamente, a partire dall'estremità prossimale del nervo reciso, comincia il processo di rigenerazione nervosa e di crescita assonale, il quale può definirsi concluso quando i nuovi assoni raggiungono il moncone distale del nervo reciso.

4.1 Descrizione delle neuroguide

A partire dai primi anni '80 la chirurgia sostitutiva, utilizzando condotti nervosi artificiali realizzati con materiali non biorassorbibili come il silicone, ha cominciato ad analizzare un metodo alternativo per il trattamento dei nervi recisi. In letteratura è possibile reperire l'articolo di F. F. A. IJPM, R. C. VAN DE GRAAF e M. F. MEEK, intitolato "*THE EARLY HISTORY OF TUBULATION IN NERVE REPAIR*" dove troviamo rapporti che documentano recuperi parziali unicamente riferiti alla continuità morfologica di un nervo con uno spazio

estremamente piccolo, di circa 10 mm, in piccoli animali da laboratorio, mentre il recupero della funzione motoria veniva raggiunto raramente con questi condotti. Il risultato non raggiungeva in alcun modo esiti migliori rispetto a quelli dell'autotrapianto di nervi in nessuno dei casi riportati.

Basandosi sulle conoscenze sopra citate la ricerca scientifica ha continuato gli studi sulla progettazione di *scaffold* con particolari proprietà che permettono la rigenerazione, utilizzando tubi di guida nervosi noti come neuroguide o condotti nervosi.

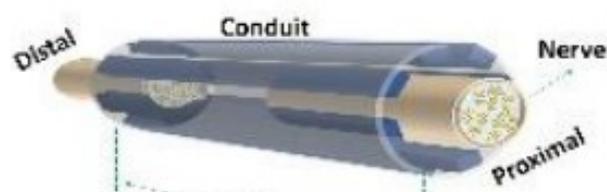


Figura 6: schematizzazione di una neuroguida

Le neuroguide possono essere descritte come condotti per la guida della rigenerazione nervosa, costituiti da materiali sintetici o naturali, che funzionano come strutture tubolari suturate o fissate ai due monconi del nervo reciso, atte a collegare i ceppi distali e prossimali, fungendo al contempo sia da guida, per la rigenerazione assonica, sia da barriera contro la crescita cicatriziale, fornendo un ambiente adeguato alla rigenerazione del nervo.

4.2 Confronto con gli innesti autologhi

L'autotrapianto nervoso, o trapianto di nervi autologo, ad oggi, secondo la letteratura scientifica, rimane il trattamento comunemente più utilizzato per colmare il vuoto tra i monconi prossimale e distale del nervo e promuoverne la rigenerazione nel trattamento delle lesioni nervose.

Considerate le criticità della tecnica, già evidenziate, si sono valutate delle alternative rappresentate dagli alloinnesti nervosi.

Come gli autoinnesti nervosi, anche gli alloinnesti, ossia innesti provenienti da un donatore, rappresentano tecniche standard utilizzate per trattare i nervi sezionati. Anche questa tecnica

presentando diversi svantaggi, in particolare associati ad un'elevata morbilità e quindi alla necessità di trattamenti di immunosoppressione.

Tenendo conto di questi limiti la ricerca sta perseguendo metodi alternativi che, sfruttando l'ingegneria tissutale, possa offrire risultati di maggior successo, limitando le controindicazioni.

4.3 Caratteristiche delle neuroguide

L'utilizzo delle neuroguide, o condotti di guida nervosa, rappresenta una alternativa agli autotrapianti e si sta affermando negli ultimi anni grazie alla sua efficacia e alle minori complicanze annesse.

Questa procedura viene anche definita tubulizzazione in quanto prevede l'impiego di strutture tubolari, specificamente progettate per collegare i monconi distali e prossimali di un nervo sezionato, agendo sia come guida per la rigenerazione degli assoni lungo l'asse prossimale-distale, sia come barriera contro la crescita interna del tessuto cicatriziale.

Questi condotti rappresentano un ponte fra le terminazioni nervose danneggiate e forniscono un supporto strutturale e trofico ad entrambe le estremità, prevenendo la crescita interna del tessuto fibroso nel sito della lesione e conservando i fattori neurotrofici secreti dalle estremità nervose lesionate. La diffusione dei fattori di crescita e dei chemioattrattivi aiuta a dirigere la rigenerazione del nervo attraverso gradienti di diffusione, verso il moncone distale.

L'utilizzo di questi dispositivi fornisce protezione al nervo e impedisce l'infiltrazione del tessuto fibroso della cicatrice durante il recupero, permettendo così un aumento sia in termini di quantità che di velocità e lunghezza degli assoni in rigenerazione.

Sotto determinate condizioni è inoltre possibile che, dopo la sutura del tubo alle estremità dei monconi recisi, il fluido assoplasmatico essudato dai monconi nervosi, ricco di proteine, venga rilasciato nella guida portando alla formazione di una neomatrice di fibrina che fornirà un adeguato supporto per la migrazione e lo sviluppo delle cellule di Schwann, dei fibroblasti e dei macrofagi.

Questo processo, suddivisibile in 5 fasi, in continuità l'una con l'altra, permette una adeguata crescita assonale nel lume del condotto neurale e una corretta rigenerazione del tessuto nervoso che va a colmare la lacuna formatasi a seguito della lesione.

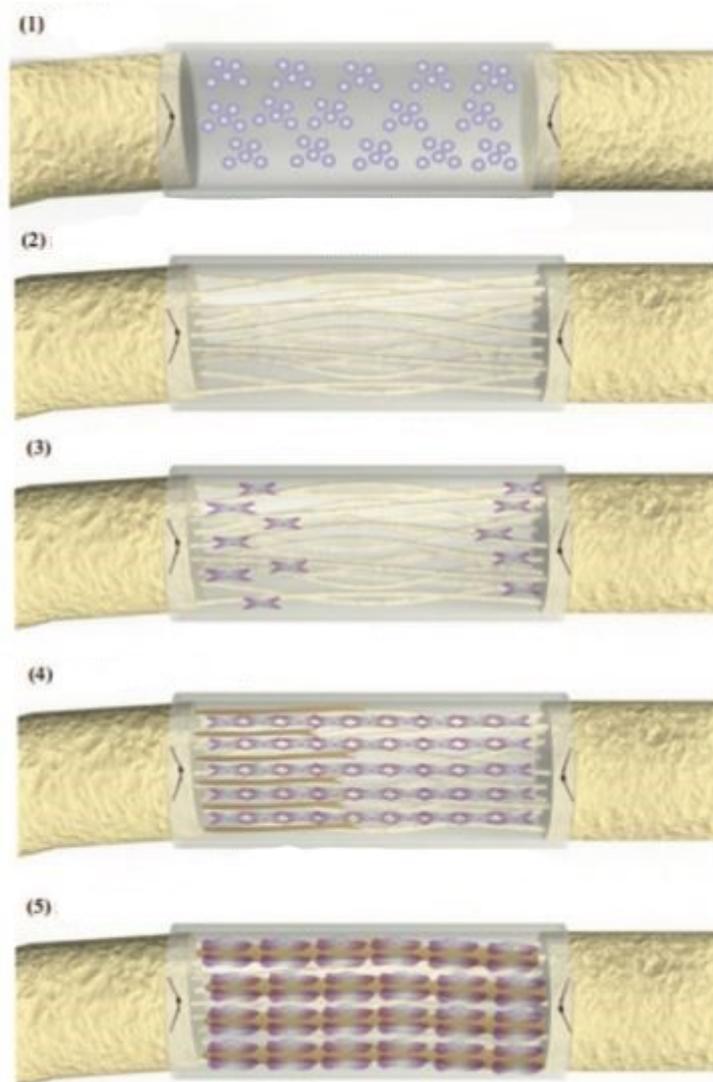


Figura 7: rappresentazione delle fasi del processo rigenerativo all'interno della neuroguida

1. Fase fluida: accumulo di fattori neurotrofici e molecole della ECM
2. Fase matriciale: formazione della rete di fibrina
3. Fase cellulare: migrazione delle cellule di Schwann, proliferazione e allineamento delle fibre nervose
4. Fase assonale: crescita dei nuovi assoni dal moncone prossimale al distale
5. Fase di mielinizzazione: mielinizzazione degli assoni rigenerati e formazione delle fibre assonali mature

I primi modelli di neuroguide erano realizzati con tubi in silicone non riassorbibile, in grado di assistere la rigenerazione nervosa ma con rischio di provocare stenosi del rigenerato e di renderne necessaria la rimozione.

Lo sviluppo scientifico si è allora concentrato nella ricerca di biomateriali più adeguati alla progettazione dei condotti nervosi, apportando miglioramenti nel processo di fabbricazione e nel processo di interazione e integrazione con il tessuto biologico.

Ciò ha portato allo sviluppo di nuovi dispositivi realizzati attraverso studi di ingegneria tissutale a base di biopolimeri naturali o sintetici che hanno l'obiettivo di fornire segnali meccanici, biologici e biochimici all'organismo ricevente.

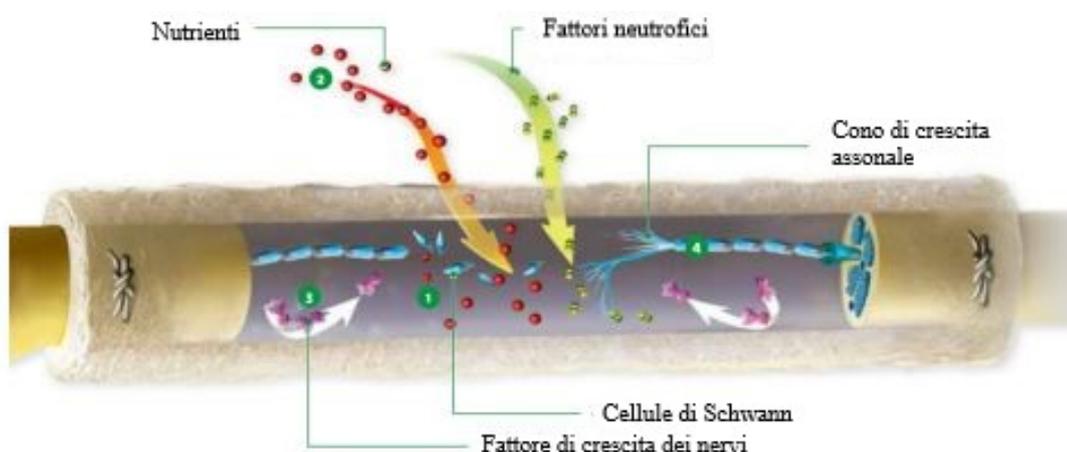


Figura 8: Schema raffigurativo del processo di rigenerazione neurale e dei fattori coinvolti

Lo studio dei risultati clinici presenti in letteratura ha evidenziato come i risultati raggiunti con l'utilizzo delle neuroguide siano comparabili con il metodo gold-standard dell'autoinnesto a livello di successi ottenuti, apportando inoltre il significativo vantaggio di evitare il sacrificio di un altro nervo dal sito donatore.

Oltre alla lunghezza anche il diametro interno del condotto cilindrico è correlato in modo inversamente proporzionale al successo della rigenerazione, effetto che sembra essere causato all'insorgere di una insufficiente rivascolarizzazione all'interno del lume per le guide di calibro maggiore.

Nella scelta del biomateriale per la realizzazione delle neuroguide è fondamentale valutarne la conducibilità elettrica in quanto la funzione dei neuroni è quella di condurre segnali elettrici. Risulta quindi fondamentale progettare *scaffold* realizzabili con materiali conduttivi che

consentano la trasduzione del segnale elettrico attraverso un nervo reciso e che siano in grado di fornire uno stimolo elettrico locale all'area rigenerante. È stato anche dimostrato che la stimolazione elettrica modula la produzione del fattore di crescita.

Altro aspetto fondamentale è la porosità della parete del condotto, la quale deve essere limitata in modo da soddisfare la necessità di prevenire l'infiltrazione di cellule infiammatorie nel condotto stesso e di minimizzare la diffusione di fattori di crescita al di fuori del medesimo. È stato dimostrato che le dimensioni ottimali dei pori rientrano nell'intervallo 5-30 μm , meglio ancora se di dimensione 10-20 μm .

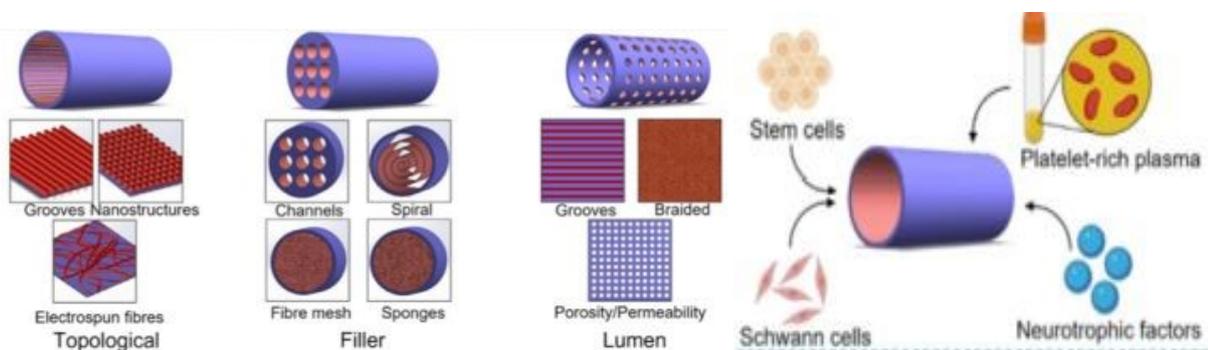


Figura 9: caratteristiche morfologiche e funzionalizzazioni biologiche attribuibili alle neuroguide

Sarà quindi necessario sviluppare delle neuroguide aventi i seguenti requisiti:

- essere costruiti in materiale duttile, e morbido, in modo da prevenire la compressione degli assoni rigeneranti e limitare l'infiammazione dei tessuti;
- risultare flessibile in modo da riprodurre le proprietà di struttura del tessuto nervoso;
- avere dimensioni longitudinali appropriate per facilitare il superamento del *gap* nervoso senza tensione;
- avere diametro interno e spessore della parete tali da non influenzare la velocità di rigenerazione del nervo e la rivascolarizzazione del tessuto;
- presentare una bassa antigenicità per limitare i fenomeni di rigetto;

- essere porosi rispetto alle sostanze in grado di facilitare la crescita assonale ed al contempo impermeabili a quelle che possono rallentarla; devono quindi essere semipermeabili, per consentire la diffusione di ossigeno e sostanze nutritive dal liquido interstiziale al tessuto nervoso attraverso i pori nella parete del condotto.
- fornire un segnale di guida, tramite la struttura tubolare 3D, per la crescita dell'assone in estensione;
- funzionare come *dispenser* per fattori trofici in modo da supportare anche biochimicamente il tessuto rigenerato;
- prevenire la crescita interna di tessuto fibroso nel sito della lesione e trattenere i fattori neurotrofici secreti dalle estremità nervose danneggiate;
- essere biodegradabili, pur mantenendo un'architettura meccanicamente stabile durante il processo di rigenerazione ma, allo stesso tempo, resistenti allo strappo delle suture e all'infiammazione dei tessuti;
- essere sterilizzabili con le comuni metodologie;
- essere facilmente reperibili ed avere un costo adeguato.

4.4 *Design delle neuroguide*

In funzione del sito e del tipo di lesione nervosa da riparare sono stati studiati diversi *design* per la realizzazione delle neuroguide:

- *Design cavo non poroso*: Il *design* cavo non poroso è il più semplice e consiste in un tubo cavo semplice, realizzato con polimeri naturali o sintetici. I vantaggi di questo design sono la facilità di fabbricazione e la ripetibilità. I suoi limiti, dovuti alla non porosità, includono la scarsa permeabilità ai nutrienti e ai fattori di crescita, ostacolando in parte la rigenerazione del nervo. Ulteriore limitazione è l'assenza di segnali topografici per l'allineamento direzionale dei neuroni dal moncone prossimale al moncone distale;
- *Design multicanale*: Il design multicanale, con molteplici canali intraluminali, è più diffuso ed efficace in quanto permette il corretto allineamento delle fibre nervose rigeneranti;

- Design poroso: è stato sviluppato con l'obiettivo di migliorare la permeabilità della guida. A seconda del metodo di fabbricazione i condotti nervosi porosi possono essere di tipo fibroso o non fibroso.

Durante la realizzazione di questi condotti nervosi risulta fondamentale controllare attentamente il livello di porosità e la dimensione dei pori in quanto questi influiscono largamente sulle proprietà meccaniche della neuroguida.

È stato infatti dimostrato che le proprietà meccaniche diminuiscono all'aumentare della dimensione dei pori e che gli *scaffold* aventi una dimensione di pori maggiore si sono degradati più velocemente di quelli con una dimensione di pori più piccola.

- Design con riempitivi in fibra o hydrogel: le neuroguide con riempitivi contengono fibre elettrofilate o hydrogel nel lume o nei canali intraluminari. Poiché le neuroguide multicanali, fabbricate utilizzando l'elettrofilatura, risultano costose, di scarsa ripetibilità e riproducibilità, si è proposto l'inserimento dei riempitivi all'interno del lume, ad imitazione del fascicolo nervoso. Biomolecole come la laminina e il fattore di crescita del nervo sono state incorporate nei riempitivi di nanofibre. I risultati *in vivo* hanno rivelato che le neuroguide con riempitivi di fibre si sono comportate meglio degli autoinnesti in termini di reinnervazione muscolare e di test di latenza riflessa da astinenza.

- Design scanalato: Questa tipologia di neuroguide presenta scanalature sulla superficie interna della struttura tubolare in quanto si ritiene che le scanalature possano allineare meglio gli assoni durante la fase di rigenerazione. Tuttavia, data la geometria complessa e i problemi di fabbricazione, questo tipo di design non ha avuto grande sviluppo. Il design scanalato ha come vantaggio la possibilità di ottenere l'incorporazione di fattori di crescita bioattivi nel lume, come il fattore di crescita dei fibroblasti I, producendo una migliore rigenerazione del nervo.



Figura 10: design delle neuroguide, da sinistra: cavo, multicanale, poroso, con riempitivi in fibra o hydrogeel, scanalato

L'utilizzo coordinato di polimeri sintetici e naturali biodegradabili potrebbe essere una buona opzione per la rigenerazione dei nervi e per la progettazione di tubi cavi riempiti con materiali diversi, ottenendo porosità, dimensione dei pori, morfologia e resistenza ottimali.

4.5 *Neuroguide realizzate con polimeri naturali*

Come già osservato le neuroguide, per essere adatte all'innesto nell'organismo e alla rigenerazione neurale, devono soddisfare determinati requisiti di biocompatibilità, biodegradabilità, proprietà meccaniche compatibili con quelle dei nervi e conduttività elettrica.

Attualmente, i materiali utilizzati per la realizzazione di neuroguide possono essere di natura biologica o sintetica.

I polimeri naturali sono quelli che maggiormente promuovono la rigenerazione assonale grazie al rilascio di fattori di crescita nervosa che, affiancati da una corretta somministrazione di farmaci, permettono la proliferazione delle cellule nervose.

Pur fornendo un ambiente biomimetico favorevole alle cellule, hanno proprietà meccaniche non sempre adeguate, stabili e riproducibili; questa è la principale limitazione al loro utilizzo per applicazioni nell'ingegneria dei tessuti e, in particolare, per la fabbricazione di *scaffold* 3D.

4.5.1 *Collagene*

Il collagene è una proteina contenuta nei tessuti connettivi dell'uomo e degli animali e rappresenta il componente principale della matrice extracellulare. È costituito da 3 catene polipeptidiche strettamente intrecciate tra loro, in modo da formare una tripla elica compatta.

Ogni filamento assume una struttura terziaria caratterizzata da un particolare tipo di elica sinistrorsa. Tre singoli filamenti elicoidali si organizzano in una super elica destrorsa che costituisce la superstruttura quaternaria del tropocollagene. I fattori di stabilizzazione delle molecole di collagene sono legati alle interazioni tra le 3 eliche, costituenti la super elica, e sono dovuti a legami ad idrogeno, legami ionici e alle reticolazioni intercatena.

Le fibre di collagene presentano un'organizzazione strutturale caratteristica sia a livello submicroscopico che microscopico, organizzata in fasci: la singola fibra di collagene è composta da una matassa di numerose macrofibrille; ciascuna macrofibrilla è costituita a sua volta da molte microfibrille, ciascuna delle quali è composta da molte eliche di tropocollagene.

Esistono 25 tipi di collagene tutti caratterizzati dalla presenza di elementi di tropocollagene, ma collegati tra loro in modo diverso. Il collagene di tipo I è quello maggiormente impiegato per applicazioni industriali ed è predominante nel nervo periferico intatto. Per questo motivo, il collagene è spesso impiegato per fabbricare neuroguide per la rigenerazione dei nervi periferici. È un materiale naturale biodegradabile con elevata biocompatibilità, bassa antigenicità, noto per favorire la crescita dei neuriti e la rigenerazione dei nervi in quanto aiuta a mantenere le funzioni biologiche delle cellule. Presenta tuttavia una scarsa resistenza meccanica, un elevato assorbimento all'acqua e una rapida degradazione, caratteristiche non indicate per la rigenerazione dei nervi.

Gli scaffold realizzati a base di collagene di tipo I sono utilizzati includendo fibre, inserite all'interno del lume del condotto per fungere da riempitivi, e formulazioni di hydrogel per fornire cellule, farmaci o fattori di crescita. Alcuni studi hanno dimostrato che i filamenti di collagene incorporati nelle neuroguide aiutano a guidare le nuove fibre nervose poiché migliorano la permeabilità e la superficie esposta al tessuto circostante.

4.5.2 *Chitosano*

Il chitosano è un biopolimero polisaccaride cationico di origine naturale, ottenuto per acetilazione alcalina della chitina, ossia per acetilazione di unità monomeriche N-acetilglucosamina unite tra loro da legami glicosidici.

Il chitosano rappresenta il più grande polisaccaride strutturale a base di azoto costituito da subunità ripetute di glucosio modificato ed è considerato un biomateriale funzionale con un potenziale di applicazione maggiore rispetto alla cellulosa in quanto gode di 4 proprietà fondamentali:

- biocompatibile: non induce alcuna risposta immunitaria;
- bioattivo: supporta la rigenerazione neurale in modo equiparabile all'autotrapianto;
- antibatterico: limita i rischi di infezione;
- antiadesivo: inibisce il tessuto cicatriziale e la formazione di neuroni.

Presenta inoltre ottime proprietà di biodegradabilità, bassa tossicità, non immunogenicità, basso costo e grande disponibilità.

Grazie alla capacità di facilitare l'attaccamento e la proliferazione delle cellule di Schwann, l'adesione e la differenziazione, il chitosano ha un grande potenziale per la rigenerazione dei nervi. Per contro, le caratteristiche strutturali di questo biopolimero non sono adatte per la costruzione di neuroguide poiché presenta una resistenza meccanica relativamente bassa e pertanto, in condizioni fisiologiche, una incapacità a mantenere un determinato assetto strutturale necessario per guidare le nuove fibre.

4.5.3 *Fibroina della seta*

La fibroina della seta è una proteina naturale, un biopolimero, estratta dai bozzoli di Bombyx Mori, meglio noti come bachi da seta. Gode di molte proprietà tra cui la biodegradabilità, la biocompatibilità e la robusta resistenza meccanica associata ad un'elevata resistenza alla trazione. La fibroina della seta viene solitamente disciolta in solventi a base d'acqua e può essere facilmente modellata in vari formati di materiale, tra cui pellicole, hydrogel e spugne, mediante varie tecniche di fabbricazione.

4.5.4 *Alginato*

L'alginato è un copolimero polisaccaride anionico estratto da alghe brune. È un materiale che gode di molte proprietà favorevoli all'utilizzo *in vivo*: è biocompatibile, biodegradabile, sterilizzabile senza degradazione, idrofilo e le sue proprietà fisiche possono essere facilmente modificate variando il rapporto dei monomeri e il peso molecolare della catena polimerica.

L'alginato può reticolare con ioni metallici bivalenti, in particolare Ca²⁺, per formare *hydrogel* e, nel caso della rigenerazione dei nervi periferici, viene utilizzato come gel inserito nel lume del condotto per guidare le nuove fibre nervose.

La letteratura scientifica riporta che la rigenerazione del tessuto nervoso richiede anche la degradazione di una certa quantità di gel, per poter aprire spazio nel lume. Questo gel di solito deriva dalla reticolazione di alginato con ioni di calcio e la degradazione del gel inizia con la diffusione degli ioni Ca^{2+} , consentendo il graduale scioglimento delle reticolazioni.

4.5.5 *Poliidrossibutirrato e poliidrossivalerato*

Il poliidrossibutirrato è un materiale polimerico biorisorbibile prodotto mediante fermentazione seguita da estrazione con solvente da colture batteriche con substrati di carbonio.

È un polimero altamente biodegradabile, non tossico e biocompatibile. Tra le sue caratteristiche più importanti vi sono l'alto grado di cristallinità, la sua insolubilità in acqua e la relativa resistenza alla degradazione idrolitica.

Il suo copolimero è il poliidrossivalerato; come il poliidrossibutirrato è della famiglia dei poli-idrossi-alcanoati. Si tratta di polimeri naturali, di origine biologica a base di acidi grassi a catena media e corta che godono di eccellenti proprietà come la capacità di assorbimento, bassa citotossicità, piezoelettricità, termoplasticità, biocompatibilità e la biodegradabilità che lo rendono un materiale promettente per molte applicazioni in un'ampia varietà di settori. Il suo utilizzo rimane però limitato a causa del suo alto costo di produzione.

4.6 *Neuroguide realizzate con polimeri sintetici*

Per la fabbricazione delle neuroguide è molto diffuso anche l'utilizzo di polimeri sintetici biorisorbibili. Si tratta di materiali ottenuti attraverso una sintesi chimica che hanno la capacità di degradarsi completamente in vivo entro la fine della rigenerazione così da ridurre la risposta immunitaria dall'organismo e il rischio di effetti avversi. I polimeri sintetici possiedono buone proprietà meccaniche ma sono meno adatti a favorire la proliferazione cellulare rispetto a quelli di origine biologica.

4.6.1 *Alcool polivinilico (PVA)*

L'alcol polivinilico (PVA) è un composto chimico ottenuto per idrolisi, di norma alcalina, degli esteri polivinilici e possiede determinate caratteristiche che lo rendono termoplastico, solubile in acqua e insolubile nei solventi organici, biodegradabile e semicristallino, oltre a non possedere permeabilità ai gas.

Queste proprietà dipendono dalla percentuale in peso di acqua, dall'idratazione, dal grado di idrolisi e dal peso molecolare. L'assorbimento di livelli d'acqua più elevati funge da plastificante, riduce la resistenza alla trazione del polimero ma ne aumenta la deformazione a rottura.

Grazie alle proprie specifiche caratteristiche, ed in considerazione della sua biocompatibilità, non tossicità, non cancerogenicità e facilità di lavorazione, il PVA è stato classificato come biomateriale polimerico ad uso clinico dalla FDA e ha ottenuto la Conformità Europea (CE).

Seppur il PVA sia dotato di notevoli vantaggi che lo rendono un materiale ideale per la realizzazione di *scaffold* utili alla rigenerazione neurale, il principale limite all'utilizzo di tale composto chimico è legato alla capacità di degradazione in ambiente biologico: il PVA, infatti, sotto forma di hydrogel reticolato, presenta una scarsa capacità di biodegradazione.

Per questo motivo è stata sondata una tecnica per migliorarne l'efficacia trovando ottimi riscontri nell'utilizzo del PVA parzialmente ossidato con permanganato di potassio, con cloro, bromo e iodio, migliorando la cinetica di biodegradazione.

In particolare questi ultimi due elementi offrono una buona capacità di non alterare il peso molecolare del polimero.

L'ossidazione dei gruppi ossidrilici a gruppi carbonilici ha inoltre consentito di introdurre nella catena polimerica funzionalità chimiche più reattive che possono essere utilizzate per legare farmaci o fattori di crescita bioattivi.

4.6.2 Policaprolattone (PCL)

Il policaprolattone è uno dei polimeri sintetici più comunemente utilizzati nella fabbricazione di neuroguide. Possiede ottime proprietà meccaniche, facile lavorabilità e compatibilità con altre sostanze.

Le neuroguide realizzate con questo polimero offrono segnali topografici agli assoni per la rigenerazione dei nervi periferici; tuttavia la scarsa biodegradabilità è la loro principale carenza che ne limita una più ampia applicazione.

4.6.3 Copolimeri di acido polilattico (PLA) e di policaprolattone (PLC)

IL PLA-PLC è un copolimero poliestere a base di polilattico e policaprolattone. Rispetto ad altri materiali biodegradabili è maggiormente idrofobo e può portare a tempi di degradazione più elevati. I problemi derivanti dalla sua degradazione in vivo, tuttavia, arrecano un minor danno al tessuto circostante perché i prodotti di degradazione sono meno acidi rispetto al PGA o al PLGA.

4.6.4 Acido poliglicolico (PGA)

L'acido poliglicolico è un poliestere alifatico biodegradabile, ricavato dalla polimerizzazione dell'acido glicolico ed è noto in campo biomedico come materiale per la produzione di fili da sutura.

Trattandosi di un polimero biodegradabile può essere degradato dall'anidride carbonica e dall'acqua, con un tasso di degradazione relativamente veloce, ed i suoi prodotti di degradazione possono essere assorbiti dal corpo umano. Ha anche una resistenza meccanica superiore ad altri polimeri biodegradabili.

Viene assorbito dall'organismo entro 90 giorni dall'innesto attraverso un meccanismo di idrolisi. In alcuni studi il solo acido poliglicolico si ritiene possa avere un tasso di degradazione troppo rapido che può avere effetti negativi per le lacune nervose più grandi. In fase di degradazione, inoltre, i prodotti rilasciati hanno natura acida e portano alla diminuzione del pH nel sito di impianto, che può innescare una risposta immunitaria.

Per far fronte a queste criticità è stato proposto un nuovo approccio che prevede il suo utilizzo non come materiale centrale del condotto nervoso ma come semplice riempitivo, specialmente in combinazione con altri polimeri come il chitosano e il collagene.

4.6.5 Acido polilattico-co-glicolico (PLGA)

L'acido poli(lattico-co-glicolico) è un polimero biodegradabile, biocompatibile sintetico ottenuto con una combinazione di acido glicolico e lattico, la cui degradazione può venire controllata regolando il rapporto dei due monomeri PLLA/PGA. Maggiore è il contenuto di PGA, più rapida sarà la degradazione. La capacità di variare la tempistica di degradazione permette di adattare il materiale ai diversi tipi e dimensioni degli spazi nervosi da rigenerare.

4.6.6 *Acido polisialico (PSA)*

L'acido polisialico è un materiale biocompatibile e biorisorbibile relativamente nuovo per i condotti nervosi artificiali. In condizioni di coltura cellulare il PSA mostra stabilità e consente la degradazione indotta dagli enzimi. È stato anche scoperto di recente che il PSA è coinvolto nei processi di guida come la neuritogenesi, la ricerca del percorso assonale e la migrazione dei neuroblasti.

4.7 *Neuroguide realizzate con materiali compositi a matrice polimerica*

Per superare i limiti dei singoli materiali naturali e sintetici, sono stati realizzati anche *scaffold* compositi naturali-sintetici che possiedono sia buone proprietà meccaniche, sia affinità cellulare. Questi *scaffold* compositi hanno grandi prospettive di sviluppo nell'ingegneria dei tessuti e nella produzione di neuroguide. Spesso si utilizza una miscela di polimeri naturali e sintetici in cui i polimeri naturali forniscono un ambiente biomimetico per le cellule, mentre i polimeri sintetici forniscono un adeguato supporto strutturale/meccanico.

Esempi di polimeri sintetici, miscelati tra di loro, che sono stati utilizzati per la fabbricazione di neuroguide sono la miscela di PCL e PLGA, PCL e poliurea, PLGA e poliuretano (PU), PLLA e PLGA o PLCL e glicole polipropilenico (PPG).

Sono state realizzate inoltre miscele polimeriche complesse a più componenti, ottenendo ottimi risultati e dimostrando quindi la fattibilità dell'uso di miscele polimeriche che combinano le proprietà uniche di ciascuno dei polimeri costituenti, migliorando la rigenerazione nervosa grazie alla fabbricazione di neuroguide biocompatibili, biodegradabili, bioattive e che possiedono proprietà meccaniche appropriate.

4.8 *Neuroguide realizzate con polimeri conduttivi*

Requisito fondamentale per una buona rigenerazione nervosa è la buona conduzione dello stimolo elettrico attraverso il neo-tessuto nervoso. Per questo motivi si è studiata l'efficacia di polimeri conduttivi per la realizzazione delle neuroguide.

Numerose sperimentazioni hanno dimostrato che la proliferazione e la crescita delle cellule nervose, nonché l'estensione assonale, potrebbero essere migliorate attraverso un'appropriata stimolazione elettrica.

In riferimento a questo, la conduttività elettrica dei materiali dello scaffold può essere considerata una proprietà favorevole alla rigenerazione del tessuto neurale; è stato infatti dimostrato che con l'applicazione di una piccola differenza di potenziale si raddoppia l'attività di formazione di tessuto nervoso.

I polimeri conduttivi sono dei materiali plastici, in grado di condurre la corrente elettrica. Possiedono buona capacità di adesione cellulare, eccellenti proprietà meccaniche ed idrofilia superficiale regolabile. Possono condizionare direttamente lo stato e la migrazione delle cellule, trasmettere segnali elettrici e produrre una stimolazione elettrica.

Questi polimeri vengono utilizzati come rivestimento degli *scaffold* in modo da renderli conduttivi; i più diffusi sono il polipirrolo, la polianilina, nanotubi di carbonio e composti di ossido di grafene.

Il fluoruro di polivinilidene (PVDF) è stato individuato come un polimero promettente per fabbricare neuroguide; risulta infatti essere un materiale piezoelettrico che possiede proprietà particolari, tra cui la grande resistenza chimica, la stabilità termica, la grande biocompatibilità e la capacità di autorigenerazione. È stato dimostrato inoltre che il PVDF migliora la rigenerazione assonale. Di contro comporta però una seconda procedura chirurgica di asportazione a causa della insufficiente biodegradabilità del materiale.

Il grafene e i suoi derivati possiedono proprietà meccaniche e conduttività elettrica superiori. Il grafene può venire combinato con altri polimeri per migliorarne le proprietà meccaniche ed elettriche. L'ossido di grafene, ad esempio, è un materiale non conduttivo che possiede una maggiore compatibilità con i biomateriali polimerici, più facile da maneggiare con una dispersione in soluzione superiore.

4.9 *Aspetti morfologici interni*

Altro aspetto che ha prodotto risultati apprezzabili per il miglioramento dell'efficacia di una neuroguida è la realizzazione di una specifica morfologia interna del condotto.

Si è infatti osservato che aggiungere canali orientati longitudinalmente a un condotto, per fornire agli assoni rigeneranti una guida ben definita, migliora la loro crescita lungo lo *scaffold*. In uno *scaffold* con architettura a canale microtubulare, gli assoni rigeneranti sono in grado di estendersi attraverso i canali longitudinali aperti nel modo in cui, normalmente, si estenderebbero attraverso i tubi endoneurali dei nervi periferici, aumentando inoltre la superficie disponibile per il contatto cellulare. I canali vengono solitamente creati inserendo un

ago, un filo o una seconda soluzione polimerica all'interno dell'impalcatura. Dopo aver stabilizzato la forma del polimero principale, l'ago, il filo o il secondo polimero vengono rimossi per formare i canali. In genere vengono creati più canali ma l'impalcatura può essere costituita anche da un solo grande canale.

Oltre ai canali orientati longitudinalmente è anche possibile aggiungere fibre orientate longitudinalmente a un condotto per fornire agli assoni rigeneranti una guida per la crescita diretta longitudinalmente. L'aggiunta di filamenti a un'impalcatura, infatti, promuove la guida della rigenerazione interna e aumenta la permeabilità per un migliore scambio di nutrienti e scarti. In tal modo l'impalcatura offre prestazioni di riparazione dei nervi superiori rispetto ai condotti non permeabili privi di filamenti.

4.10 Utilizzo delle nanotecnologie

Lo sviluppo delle nanotecnologie ha avuto un'influenza rilevante nell'ingegneria dei tessuti neurali, permettendo lo sviluppo di scaffold che aiutano la rigenerazione dei nervi danneggiati. A causa della complessa fisiologia della rigenerazione del tessuto nervoso, gli *scaffold* per la rigenerazione richiedono caratteristiche che favoriscono la proliferazione, la differenziazione e la migrazione delle cellule neuronali e gliali. Pertanto, sono necessari *scaffold* tridimensionali, che imitano le complesse proprietà fisiologiche e i segnali chimici della matrice extracellulare e che consentono la migrazione guidata cellulare e assonale *in vitro* e *in vivo*.

Questi *scaffold* devono anche fornire un ambiente vitale per la crescita cellulare, non suscitare alcuna risposta immunitaria, avere un'area superficiale elevata per consentire il movimento dei nutrienti e fornire un forte supporto, pur essendo in grado di degradarsi a una velocità uguale, o più lenta, rispetto alla velocità di rigenerazione. Il controllo su nanoscala sull'assemblaggio molecolare e sulla topografia offre la possibilità di introdurre alcune delle caratteristiche che permettono il controllo spaziale e temporale con un potenziale impatto significativo sulle strategie di guida del nervo. Tre importanti caratteristiche degli *scaffold* che promuovono la rigenerazione dei nervi includono biocompatibilità, biodegradabilità e porosità. Inoltre, come discusso in precedenza, la presenza di segnali topografici e biochimici, resa possibile da tecniche di modellazione su scala nanometrica, può influenzare significativamente la rigenerazione.

La nanotecnologia è in grado di migliorare le prestazioni dello *scaffold* per mezzo delle sue proprietà dimensionali che svolgono un ruolo importante nella ricostruzione del nervo.

L'impiego di tecniche come i campi magnetici per l'autoassemblaggio e l'orientamento di nanofibre e l'utilizzo di un *design* controllato, potrebbe portare, ad esempio, a buoni risultati nella ricostruzione del nervo con il metodo dell'elettrofilatura.

4.11 *Tecniche di fabbricazione*

Le caratteristiche specifiche richieste per la realizzazione delle neuroguide, quali le indicazioni topografiche per l'allineamento assonale ed i vincoli dimensionali, impongono specifiche metodologie produttive diverse da quelle utilizzate per i classici *scaffold*, come lo stampaggio ad iniezione, che è ampiamente utilizzato per la produzione di neuroguide multicanale.

Per la lavorazione delle neuroguide le tecniche che vengono citate in letteratura sono modifiche al pattern di superficie del condotto, come scanalature, pilastri, fibre, o in alternativa utilizzo di materiali di riempimento, come spugne, fibre, canali e caratterizzazione della parete luminale attraverso porosità, permeabilità, e caratteristiche anisotropiche. Tutte queste implementazioni possono essere combinate con una funzionalizzazione della superficie attraverso l'aggiunta di peptidi, o rivestimenti conduttivi, per migliorare l'attaccamento e la migrazione dei neuroni in superficie oltre che con fattori biologici e fattori neurotrofici, quali il fattore di crescita nervosa, per formare la neuroguida.

Le tecniche più utilizzate per la produzione delle neuroguide sono:

- **Stampa ad iniezione:** la tecnica di stampa ad iniezione (*injection molding*) viene utilizzata per fabbricare neuroguide con canali intraluminali. Prevede un processo di formatura a bassa pressione con evaporazione rapida del solvente, combinata con una separazione di fase indotta dal calore. Vengono utilizzati degli stampi nei quali vengono versati materiali come resine sintetiche allo stato fuso; successivamente gli stampi vengono raffreddati, provocando l'indurimento del materiale, che assume la forma progettata.

Questa tecnica permette la realizzazione di neuroguide con una microstruttura scanalata, con pori microsferici e pareti porose non fibrose e con una struttura nanofibrosa.

- **Micro-patterning:** la tecnica di micro-patterning viene utilizzata per fabbricare neuroguide con profili scanalati, o vari *design* interni, per l'allineamento assonale. Il primo passo di questo processo vede la realizzazione di una membrana micropattica che viene successivamente arrotolata per formare la neuroguida.

- Elettrofilatura: tale tecnica (detta anche *electrospinning*) rappresenta uno dei metodi più comunemente utilizzati per la fabbricazione di neuroguide e consiste in un processo produttivo elettrodinamico di produzione di fibre con diametri estremamente ridotti, solitamente inferiori al micron, ma anche di pochi nanometri. In questo processo si estraggono le nanofibre applicando un campo elettrico ad alta tensione a una soluzione polimerica. Il processo prevede l'utilizzo di un'elevata tensione elettrica tra la punta dell'ugello e il substrato con aspirazione delle fibre polimeriche continue all'ugello.

Il getto polimerico che si genera in questo modo viene accelerato ed allungato da un campo elettrostatico esterno che durante il percorso in aria, verso il collettore, si stira ed assottiglia. Il solvente, nel frattempo, evapora provocando la solidificazione e la deposizione di nanofibre solide su un substrato disposto sul collettore. Grazie alla riduzione delle dimensioni in scala nanometrica, le fibre ottenute hanno valori elevati di area superficiale specifica, porosità e modulo elastico.

Questa particolare tecnica è ampiamente utilizzata per la fabbricazione delle neuroguide. L'architettura nanofibrosa degli *scaffold* ottenuti presenta un rapporto superficie/volume maggiore per le cellule e la gamma di materiali che possono essere lavorati è notevolmente ampia. Il limite di tale tecnica è rappresentato dal fatto che le fibre prodotte siano orientate in maniera casuale e altamente disordinate, mentre sarebbero preferibili fibre allineate, in modo da ottenere un migliore allineamento assonale durante la rigenerazione e fornire segnali topografici essenziali per la rigenerazione assonale.

Risulta però particolarmente complessa e scarsamente produttiva.

- Stampa 3D a getto elettrodrodinamico: la tecnica di stampa 3D a getto elettrodrodinamico (electrohydrodynamic jet 3D printing, EHD-jet) è uno dei metodi adottati per superare gli inconvenienti dell'elettrofilatura. Il principale vantaggio di questa tecnica è rappresentato dal fatto che tutte le proprietà dello *scaffold*, ovvero il diametro della fibra, la dimensione dei pori, la porosità e l'allineamento delle fibre, possono essere controllate regolando i parametri di processo, oltre a permettere vantaggi di personalizzazione, ripetibilità e scalabilità.

- Stampa 3D basata sull'elaborazione della luce digitale: tale tecnica (digital light processingbased 3D printing, DLP) rappresenta un metodo di fabbricazione rapido e continuo di neuroguide. È una tecnologia di stampa 3D in cui la luce viene utilizzata per

la polimerizzazione dei fotopolimeri; in pratica una sorgente di luce proiettata viene utilizzata per polimerizzare l'intero strato in una sola volta.

- **Congelamento unidirezionale:** La tecnica di congelamento unidirezionale viene utilizzata unicamente per la fabbricazione di neuroguide con canali intraluminari allineati longitudinalmente. Questa tecnica di fabbricazione prevede l'utilizzo di una soluzione polimerica che viene raffreddata fino al congelamento, utilizzando un gradiente di temperatura ben definito ed una velocità di raffreddamento costante mediante due dissipatori di calore posti rispettivamente sopra e sotto il campione, che inducono il gradiente di temperatura.

Impostando parametri di congelamento appropriati, il fronte di ghiaccio può essere scomposto in una morfologia di cristalli di ghiaccio dendritico, senza ramificazioni laterali, che funge da stampo per la soluzione polimerica.

4.12 Dispositivi disponibili in commercio

In commercio è possibile trovare diverse tipologie di neuroguide realizzate con materiali e proprietà differenti e studiate per adattarsi al meglio alle necessità del paziente.

Qui di seguito una descrizione delle proprietà e caratteristiche delle neuroguide più comuni disponibili in commercio.

4.12.1 NeuraGen® e NeuraWrap®

Integra LifeSciences Corp, è una azienda che produce elementi di tecnologia rigenerativa di base come strumenti chirurgici, prodotti neurochirurgici e prodotti avanzati per la cura delle ferite e risulta leader in neurochirurgia offrendo un'ampia varietà di prodotti e soluzioni per l'accesso e la riparazione durale, la gestione del liquido cerebrospinale e l'assistenza neuro-critica. Grazie allo sviluppo dell'impianto Ultra-Pure Collagen, progettato specificatamente per isolare e fornire un ambiente ideale per la crescita delle cellule di Schwann e favorire l'estensione degli assoni, responsabili del recupero funzionale, sono state sviluppate la tecnologia della guida per nervi NeuroGen® e della protezione per nervi NeuraWrap®.

Questa tecnologia riduce al minimo le preoccupazioni legate ai patogeni e all'immuno-rigetto, ottenendo buoni risultati nella riparazione del nervo.

La guida per nervi NeuraGen è costituita da tre elementi fondamentali:

- strato interno poroso: garantisce la crescita cellulare verso l'interno e la corretta diffusione dei nutrienti, consente il riassorbimento controllato ed offre una adeguata resistenza meccanica alla compressione mediante il tessuto circostante;
- membrana interna uniforme: offre un ambiente idoneo all'organizzazione della crescita assonale e consente un agevole inserimento del moncone del nervo all'interno del tubo;
- membrana interna semipermeabile: consente il passaggio di piccole molecole come acqua, ioni, metaboliti e nutrienti per favorire la rigenerazione del nervo, e impedisce la fuoriuscita di fattori di crescita endogeni, come il fattore di crescita dei nervi.

La guida per nervi NeuraGen® e la protezione per nervi NeuraWrap® sono formati da collagene di tipo I semipermeabile, poroso, altamente purificato, biocompatibile, completamente assorbibile tramite le normali vie metaboliche, flessibile, duttile e resistente alla compressione, con una struttura aperta per facilitare la collocazione della sutura.

La guida per nervi NeuraGen® è un impianto riassorbibile per la rigenerazione delle discontinuità nervose periferiche; è costituito da un tubo in collagene progettato per fungere da interfaccia tra il nervo e il tessuto circostante. Fornisce un ambiente protettivo per la rigenerazione dei nervi e costituisce un canale per la crescita assonale attraverso lo spazio nervoso della porzione mancante del nervo. La membrana semipermeabile in collagene di tipo I consente un riassorbimento controllato, un'adeguata diffusione dei nutrienti e la ritenzione del fattore di crescita nervoso rappresentativo. NeuraGen® rappresenta una valida soluzione per ricongiungere nervi periferici separati eliminando la necessità di un innesto di nervo corto sulla parte mancante e la procedura di prelievo del nervo al sito donatore, con le potenziali complicazioni inerenti.

Il protettore per nervi NeuraWrap® è un impianto in collagene riassorbibile che fornisce un rivestimento non costringente per nervi periferici lesionati. È progettato per la protezione dell'ambiente neurale e per fungere da interfaccia tra il nervo e il tessuto circostante. Ricopre e mantiene la chiusura dopo il posizionamento intorno al nervo e rimane in sede durante la fase attiva della guarigione del tessuto.

Questo particolare tipo di protezione è progettato per resistere alla compressione da parte dei tessuti circostanti e per impedire la crescita di tessuto cicatriziale, in modo da ridurre al minimo la potenzialità di formazione di un neuroma e il conseguente intrappolamento del nervo.

NeuraWrap® è adottabile per la gestione delle lesioni di nervi periferici in cui non si sia verificata una perdita di tessuto nervoso sostanziale.

4.12.2 Reaxon® direct e Reaxon® nerve guide

Keri Medical è una azienda nota nell'ambiente della rigenerazione nervosa per i suoi condotti di crescita nervosa in chitosano. Questi dispositivi sono destinati alla rigenerazione delle discontinuità dei nervi periferici e sono disponibili in due tipologie:

- I tubi di protezione chiamati “Reaxon® direct – ultra flexible protection use tube”: sono altamente flessibili, presentano pareti sottili e sono destinati alla riparazione delle discontinuità dei nervi periferici in pazienti con nervi completamente separati, affiancando la sutura *end-to-end*.
- I tubi di crescita nervosa chiamati “Reaxon® nerve guide – nerve regrowth tube” sono flessibili, stabili per più di 18 mesi e non si deformano. Sono destinati alla riparazione delle discontinuità dei nervi periferici in pazienti con nervi completamente separati per una lunghezza del difetto nervoso inferiore a 26 mm.

Il chitosano che viene utilizzata nella produzione dei tubi Reaxon® è chitina di origine naturale.

Capitolo V

Risultati ed evidenze raccolte dai casi clinici analizzati dalla letteratura

In letteratura è possibile trovare svariati studi relativi alla funzionalità e adeguatezza delle neuroguide in confronto all'utilizzo degli alloinnesti e con la tecnica gold-standard dell'autotrapianto.

Sono riportati in seguito una serie di casi ripresi dalla letteratura che evidenziano i risultati della ricostruzione di *gap* nervoso mediante l'utilizzo di diverse tecniche, in modo da valutare l'efficacia delle neuroguide, il materiale, il *design* e i fattori che le rendono più adatte per una corretta rigenerazione neurale.

Per adempiere alla necessità di rigenerazione dei nervi una soluzione valida che permetterebbe di non sacrificare un altro nervo e di avere materiale impiantabile sempre disponibile potrebbe risiedere nella progettazione di una neuroguida, realizzata tramite un innesto bio-artificiale, che agisce sui meccanismi di lesione a livello molecolare, cellulare e tissutale.

I polimeri biodegradabili sono materiali largamente sperimentati, in grado di fornire contemporaneamente un'impalcatura tissutale, un veicolo di rilascio cellulare e un serbatoio per la somministrazione prolungata di farmaci.

L'architettura dell'impalcatura delle neuroguide è stata osservata con la tomografia microcomputerizzata a raggi X, fornendo immagini di interni 3D che sono state visualizzate e manipolate con specifici programmi al computer. In sintesi, si sono utilizzate misure morfologiche per stimare la percentuale del volume vuoto di un'impalcatura che mantiene i collegamenti con l'aria esterna attraverso aperture di dimensione minima.

Sulla base di questa teoria si è cominciato a sviluppare modelli di neuroguide più avanzati, dotati di fattori biochimici e fisici per favorire la rigenerazione nervosa, studiando il comportamento delle cellule e del tessuto nervoso.

5.1 Neuroguide realizzate con costrutti di fibre allineate

Un grande passo avanti nella realizzazione delle neuroguide è stato fatto incorporando fibre all'interno del condotto, in modo da guidare fisicamente la rigenerazione neurale favorendo la proliferazione degli assoni.

È stato infatti dimostrato da Y. Kim, V. K. Haftel, S.Kumar e R. V. Bellamkonda nel loro articolo intitolato "*The role of aligned polymer fiber-based constructs in the bridging of long*

peripheral nerve gaps”, che utilizzando rigorose misure anatomiche e funzionali, i costrutti che presentano fibre allineate a base di polimeri mostrano segnali topografici che facilitano la rigenerazione dei nervi periferici attraverso lunghi spazi nervosi.

Le analisi elettrofisiologiche hanno rivelato che i costrutti allineati orientati hanno guidato la rigenerazione dei nervi, sia sensoriali che motori, migliorando significativamente i risultati funzionali. Gli assoni si sono rigenerati attraverso il *gap* nervoso, i muscoli sono stati reinnervati e le giunzioni neuromuscolari riformate.

Il confronto quantitativo di due campioni contenenti, rispettivamente, fibre allineate e fibre orientate casualmente, valutati sull’analisi della crescita dei gangli della radice dorsale (DRG) e della rigenerazione dei nervi, ha dimostrato in modo evidente il ruolo significativo dei segnali topografici, su scala submicronica, nello stimolare i meccanismi endogeni di riparazione dei nervi.

Le cellule di Schwann, migrate da entrambi i monconi nervosi, si riorganizzano per creare bande di Bungner (colonne allineate di cellule di Schwann e laminina) orientate longitudinalmente, fungendo da substrati guida e da fonte di fattori neurotrofici per favorire la ricrescita assonale. Tuttavia, i condotti polimerici da soli sono limitati nella loro capacità di consentire la rigenerazione attraverso lunghi *gap* nervosi (maggiori di 15 mm nei ratti). La mancata rigenerazione del nervo attraverso lunghi spazi vuoti sembra essere il risultato della mancanza della formazione di un cavo di fibrina iniziale, necessario per la migrazione delle cellule di Schwann e alla formazione delle bande di Bungner.

In questo studio è stato utilizzato un processo di elettrofilatura per creare film polimerici sottili di 10–20 μm , realizzati con fibre polimeriche su scala submicronica (400–600 nm di diametro) allineate o orientate casualmente. Per esaminare gli effetti della topografia submicronica sono stati seminati i gangli della radice dorsale sui film *in vitro* ed è stata quantificata l'estensione della crescita dei neuriti e della migrazione delle cellule di Schwann.

Questi risultati dimostrano chiaramente l’efficienza dell'utilizzo delle fibre per creare caratteristiche topografiche orientate su scala submicronica che promuovono la stimolazione dei meccanismi di riparazione endogena, migliorando l'efficienza della migrazione delle cellule di Schwann e della crescita degli assoni attraverso il *gap* nervoso.

Un totale di 10-12 film sono stati quindi inseriti nel lume di un condotto nervoso in polisulfone diviso longitudinalmente.

Dopo 16 settimane è stata valutata l'efficienza del condotto attraverso il *grid walk*, test per valutare piccoli deficit nel controllo motorio fine, utilizzando come confronto i risultati prodotti da un autotrapianto (trattamento *gold standard*).

Per testare il ripristino della funzionalità del nervo rigenerato attraverso gli impianti, costruito polimerico o autotrapianto, è stato misurato il potenziale d'azione composto (CAP) a varie intensità di stimolo, attraverso le lacune nervose. Sedici settimane dopo l'impianto i potenziali d'azione composti misti (ossia nervi motori e sensoriali rigenerati) sono stati registrati al nervo tibiale posteriore.

Il confronto quantitativo della crescita dei gangli delle radici dorsali sul film di fibre allineate dimostra che la crescita dei neuriti, nonché della migrazione delle cellule di Schwann dai DRG, si estendeva principalmente in modo unidirezionale, parallelamente alle fibre allineate. Al contrario, l'orientamento della crescita dei neuriti e della migrazione delle cellule di Schwann sui film di fibre orientate casualmente, è stato distribuito in modo casuale.

L'analisi immunoistochimica e istomorfometrica di sezioni longitudinali, colorate con i marker neuronali per l'antigene della proteina NF160 per gli assoni rigenerati e per la proteina S-100 per le cellule di Schwann, ha rivelato che i costrutti allineati a base di fibre polimeriche facilitavano la rigenerazione nervosa dei nervi tibiali sezionati attraverso lacune nervose di 17 mm e che le cellule di Schwann si sono infiltrate nei costrutti dai monconi nervosi sia prossimali che distali. Gli assoni sezionati sono stati inseriti nell'estremità prossimale del costrutto e si sono rigenerati per l'intera lunghezza del condotto, seguendo i film di fibre allineate. Questo successo ottenuto nella rigenerazione del nervo è stato osservato in tutti i costrutti allineati.

A differenza della rigenerazione nervosa osservata attraverso i costrutti allineati, sono stati osservati numeri significativamente più bassi di NF160 e della rigenerazione assonale in tutti i costrutti basati su fibre polimeriche orientate casualmente. L'analisi istomorfometrica ha rivelato che nella porzione prossimale dei costrutti allineati sono stati osservati un numero significativamente maggiore di assoni rispetto agli autoinnesti e ai nervi normali. Gli assoni rigenerati che hanno riempito le lacune nervose di 17 mm, attraverso i costrutti allineati o gli autoinnesti, sono ricresciuti continuamente attraverso il moncone del nervo distale, hanno reinnervato il muscolo gastrocnemio interessato e ristabilito le giunzioni neuromuscolari.

L'analisi elettrofisiologica ha rivelato che i costrutti allineati hanno consentito la rigenerazione dei nervi, sia sensoriali che motori, permettendo un recupero funzionale significativamente migliore rispetto ai costrutti con fibre orientate casualmente o ai costrutti polimerici riempiti con soluzione salina.

In tutti i test CAP valutati per nervi misti, sensoriali e motori sono stati necessari livelli di stimolazione significativamente più elevati per reclutare assoni rigenerati negli animali trattati con autotrapianto e costruito allineato rispetto agli animali che non hanno subito interventi. Tuttavia questi assoni rigenerati erano funzionali, in grado di propagare potenziali d'azione e produrre una contrazione muscolare osservabile. È importante osservare che i costrutti allineati si comportavano in modo comparabile agli autoinnesti in tutte le misurazioni CAP. Negli animali trattati con costrutto orientato casualmente non sono stati rilevati CAP.

L'analisi immunoistochimica mostra chiaramente come nel costrutto realizzato con fibre allineate gli assoni del nervo tibiale sezionati sono proliferati insieme alle cellule di Schwann migrate, sono ricresciuti attraverso l'intero costrutto e si sono spostati nel moncone del nervo distale. Gli assoni rigenerati sono mielinizzati, co-localizzati con cellule di Schwann migrate e circondati da laminina depositata per via endogena. È stato osservato che gli assoni rigenerano la continuità del nervo, reinnervano i tessuti e riformano le giunzioni neuromuscolari ricche di vescicole sinaptiche insieme alle cellule di Schwann terminali. L'analisi elettrofisiologica e comportamentale dimostra inoltre che i costrutti con fibre allineate hanno facilitato la rigenerazione del nervo sia sensoriale che motorio, migliorando significativamente il deficit funzionale dopo la lesione del nervo periferico.

Questi risultati dimostrano chiaramente il significato dei segnali topografici nell'influenzare i meccanismi di riparazione endogena, al fine di favorire la rigenerazione dei nervi attraverso lacune di grandi dimensioni.

I costrutti costituiti da una pila di film in fibra submicronica allineati sono stati progettati per massimizzare i segnali direzionali topografici per la crescita dei neuriti e la migrazione delle cellule di Schwann in configurazione 3D. Questa morfologia permette di agevolare la ricreazione di bande cellulari di Bungner e fornisce segnali topografici per la migrazione delle cellule di Schwann, con conseguente massimizzazione delle capacità rigenerative innate del sistema nervoso periferico dopo la lesione.

5.2 Incorporazione delle cellule staminali all'interno delle neuroguide

Un'altra innovazione, che ha permesso di ottenere ottimi risultati per lo sviluppo della tecnologia delle neuroguide, è stata l'incorporazione di cellule staminali all'interno dei condotti, per migliorare la rigenerazione neurale.

Studiando questo approccio sono stati fatti vari tentativi per costruire innesti nervosi di ingegneria tissutale come integratori o, addirittura, sostituti degli innesti nervosi autologhi che rendano possibile colmare i difetti dei nervi periferici. L'incorporazione di cellule staminali come cellule seme in *scaffold* a base di biomateriali aumenta l'efficacia degli innesti nervosi ottenuti con ingegneria tissutale e aumenta l'efficacia del processo rigenerativo. Numerose cellule staminali, comprese le cellule staminali embrionali, le cellule staminali neurali, le cellule staminali mesenchimali del midollo osseo, le cellule staminali adipose, le cellule staminali precursori derivate dalla pelle e le cellule staminali pluripotenti indotte, sono state analizzate per il loro utilizzo nell'ingegneria dei tessuti neurali.

Nel presente studio di S.Yi et al. pubblicato in Burns & Trauma, volume 8 nel 2020, intitolato “*Application of stem cells in peripheral nerve regeneration*”, riporta una valutazione dell'efficacia dell'incorporazione di cellule staminali all'interno delle neuroguide.

Sono state inoltre valutati potenziali dubbi e prospettive della terapia con cellule staminali.

Un innesto nervoso ottenuto attraverso l'ingegneria tissutale è un innesto di nervo artificiale costruito con un'impalcatura a base di biomateriali, cellule seme e fattori neurotrofici. L'impalcatura a base di biomateriali offre un supporto fisico strutturale per la crescita e l'allungamento dei nervi feriti. Le cellule seme incorporate e i fattori neurotrofici migliorano ulteriormente l'effetto terapeutico dello *scaffold*. Le cellule di Schwann, come le cellule gliali del sistema nervoso periferico e le principali cellule strutturali e funzionali dei nervi periferici, sono state utilizzate come cellule seme naturali.

Per le lesioni dei nervi periferici con un difetto del nervo lungo (maggiore di 4-5 cm), lo *scaffold* da solo potrebbe non ottenere effetti riparativi soddisfacenti e l'applicazione di cellule di Schwann, o cellule simili a Schwann, in combinazione con un innesto nervoso risulta essenziale.

Per essere utilizzate a questo scopo, le cellule staminali vengono generalmente isolate, coltivate, espanse e infine incorporate in uno *scaffold* a base di biomateriali attraverso una procedura *in vitro*.

Le cellule staminali neurali, in quanto cellule primordiali del sistema nervoso, sono una fonte cellulare essenziale di neuroni e cellule gliali e un'importante fonte cellulare per la rigenerazione dei nervi. A seguito del loro trapianto nei nervi periferici danneggiati possono differenziarsi in neuroni o cellule di Schwann. Secernono inoltre molti fattori neurotrofici, come il fattore di crescita nervoso, il fattore neurotrofico derivato dal cervello, il fattore neurotrofico derivato dalla linea cellulare gliale, il fattore neurotrofico ciliare, la neurotrofina-3, il fattore di crescita dei fibroblasti e il fattore di crescita degli epatociti. Si tratta di fattori fondamentali per incoraggiare l'angiogenesi, la crescita nervosa e la formazione di mielina.

Uno studio di confronto mostra come, durante la riparazione di un difetto del nervo facciale di coniglio di 10 mm, i condotti nervosi combinati con cellule staminali neurali mostrano un effetto rigenerativo simile a quello degli autoinnesti nervosi e un migliore effetto rigenerativo rispetto ai condotti nervosi senza cellule seme. Le cellule staminali neurali ingegnerizzate che sovra esprimono il fattore neurotrofico derivato dalla linea cellulare gliale, rispetto alle normali cellule staminali neurali, mostrano capacità rigenerative ancora migliori nel riparare le lesioni nervose periferiche sia acute che croniche.

Le cellule staminali mesenchimali del midollo osseo possono essere facilmente raccolte attraverso l'aspirazione del midollo osseo con metodo standardizzato ed espanse su larga scala per applicazioni successive. Le cellule staminali mesenchimali del midollo osseo in coltura, inoltre, mancando di riconoscimento immunitario possono essere trapiantate allogenicamente senza indurre il rigetto. Tali cellule sono state segnalate come una delle fonti cellulari più utilizzate per la rigenerazione dei nervi.

Rispetto ad altri tipi di cellule staminali, le staminali adipose possono essere raccolte mediante una procedura di liposura meno invasiva, offrendo un grande potenziale clinico. Le capacità di proliferazione e di differenziazione delle cellule staminali adipose sono molto più elevate rispetto ad altre cellule staminali adulte. Inoltre, le cellule staminali adipose possono essere indotte in cellule che esprimono marcatori cellulari di Schwann, secernono fattori neurotrofici, stimolano la crescita dei neuriti e formano guaine mieliniche.

Detti vantaggi rendono tali cellule una buona fonte idonea a favorire i trapianti. Studi funzionali dimostrano che le cellule staminali adipose impiantate migliorano le ampiezze medie del potenziale d'azione muscolare composto.

Le cellule staminali adipose vengono anche applicate coprendo il nervo ferito con una colla di fibrina contenente le cellule. La colla di fibrina fornisce ulteriore supporto extracellulare, mentre le cellule staminali adipose non solo incoraggiano il ripristino dell'irrorazione sanguigna

e della funzione motoria, ma permettono anche la sopravvivenza dei neuroni sensoriali del ganglio della radice dorsale.

Le cellule staminali pluripotenti indotte possono differenziarsi in cellule staminali della cresta neurale o in cellule di Schwann con capacità mielinizzanti. Il trapianto di un condotto nervoso biorassorbibile seminato con cellule derivate da cellule staminali pluripotenti indotte, in un *gap* del nervo sciatico di topo di 5 mm, aumenta significativamente la crescita degli assoni e il recupero funzionale delle funzioni motorie e nervose sensoriali a 4, 8 e 12 settimane successive l'intervento. Uno studio di *follow-up* a lungo termine mostra come le cellule staminali pluripotenti indotte migliorano la rigenerazione assonale e la mielinizzazione, senza indurre teratomi a 24 e 48 settimane dopo l'intervento chirurgico. I condotti nervosi pluripotenti indotti a base di cellule staminali, quando combinati con il fattore di crescita dei fibroblasti di base, mostrano effetti rigenerativi ancora migliori.

Uno svantaggio delle cellule staminali pluripotenti indotte è mostrare similitudini con le cellule staminali embrionali, incluso il potenziale maligno. Anche la tecnologia di generazione di cellule staminali pluripotenti indotte manca di affidabilità. Tali limiti funzionali circoscrivono l'applicazione clinica delle cellule staminali pluripotenti indotte negli innesti nervosi.

Negli ultimi anni la tecnologia coinvolta nella costruzione di innesti nervosi di ingegneria tissutale ha registrato grandi progressi. L'incorporazione di cellule staminali, come cellule staminali embrionali, cellule staminali neurali, cellule staminali mesenchimali del midollo osseo, cellule staminali adipose, cellule staminali precursori derivate dalla pelle e cellule staminali pluripotenti indotte, ha potenziato gli effetti terapeutici degli innesti nervosi tissutali. L'ampia efficacia delle cellule staminali illumina il promettente futuro dell'uso clinico su larga scala delle cellule staminali.

5.3 Confronto tra il condotto *neuraGen* e l'innesto *Avance* per la ricostruzione del *gap* nervoso.

È stato effettuato uno studio per confrontare il risultato della ricostruzione del *gap* nervoso digitale con un condotto *NeuraGen* (Integra Life Sciences, Plainsboro New Jersey, USA) realizzato in collagene di tipo I e l'innesto nervoso per allotrapianto *Avance* (Axogen Inc., Alachua, Florida, USA).

Durante questa ricerca eseguita da N. Rbia et al. intitolata: “*Collagen Nerve Conduits and Processed Nerve Allografts for the Reconstruction of Digital Nerve Gaps: A Single-Institution*

Case Series and Review of the Literature” sono stati analizzati gli esiti di trentasette pazienti, con un *follow-up* minimo di 12 mesi.

L'obiettivo primario era il recupero sensoriale post-operatorio misurato mediante test di discriminazione statica a 2 punti, il quale evidenzia la capacità di identificare se due oggetti vicini che toccano la pelle sono due punti distinti o uno solo. Il test viene spesso realizzato con due estremità appuntite durante un esame neurologico e indica se l'area cutanea è correttamente innervata.

È stato utilizzato anche il test del monofilamento di Semmes-Weinstein, il quale prevede l'utilizzo di un filamento standardizzato, che viene appoggiato in modo perpendicolare alla superficie della cute del piede e lievemente premuto per circa due secondi con una pressione costante, per valutare la sensibilità pressoria cutanea.

Le misurazioni degli esiti secondari erano sulle basi delle complicanze peri-operatorie o post-operatorie.

I dati sugli esiti finali sono stati quantificati in modo da classificare i risultati del recupero sensoriale come eccellenti, buoni o scarsi.

La lunghezza media del *gap* nervoso era di $14 \pm 4,9$ mm per i condotti di collagene rispetto a $18,4 \pm 9,3$ per gli alloinnesti nervosi.

Dopo 12 mesi i risultati, espressi in percentuale, di pazienti appartenenti ad ogni classe rispetto al totale, sono stati classificati come:

	Eccellenti	Buoni	Scarsi
NeuraGen	48%	26%	26%
Avance	39%	55%	6%

Non è stato osservato nessun rigetto né estrusione dell'innesto.

Questo studio ha permesso di stabilire che i condotti nervosi e gli alloinnesti nervosi elaborati offrono convenienti opzioni per la riparazione digitale del *gap* nervoso in quanto, entrambe le tecniche, offrono mezzi efficaci per ricostruire un *gap* nervoso digitale inferiore a 2,5 cm a un minimo di 12 mesi di *follow-up*.

I dati relativi agli studi sugli animali sono stati relativamente coerenti. È stato riscontrato che i condotti nervosi del collagene sono equivalenti alla sutura diretta per difetti di 5 mm, mentre

inferiori agli autoinnesti per deficit dei nervi sensoriali motori misti di 20 mm. Gli alloinnesti nervosi elaborati sono stati ripetutamente trovati simili o inferiori all'autotrapianto del nervo, ma superiori ai condotti di collagene. Uno studio ha rilevato che i condotti mostravano un modello disorganizzato delle fibre nervose dell'innesto medio, mentre gli alloinnesti mostravano una rigenerazione delle fibre nervose distribuita uniformemente.

L'autotrapianto è il *gold standard* nella riparazione delle lesioni dei nervi periferici che non sono suscettibili di coaptazione *end-to-end*. Tuttavia, poiché gli autoinnesti provocano difetti del sito donatore e sono una risorsa limitata, un sostituto efficace sarebbe prezioso.

5.4 Caso di studio per il confronto di autotrapianto e condotti nervosi di collagene.

Questo studio comparativo di J. Y. Lee et al. intitolato: "*The effect of collagen nerve conduits filled with collagen-glycosaminoglycan matrix on peripheral motor nerve regeneration in a rat model*" viene effettuato un confronto tra la rigenerazione ottenuta attraverso tre diversi trattamenti.

In 88 ratti Lewis maschi è stato creato un difetto del nervo sciatico unilaterale di 10 mm; sono stati poi casualmente divisi in quattro gruppi sperimentali. L'obiettivo del test è stato valutare la riparazione ottenuta con autotrapianto, con condotto nervoso di collagene (NeuraGen da 1,5 mm, Integra LifeSciences), con condotto nervoso di collagene riempito con matrice di collagene e con condotto nervoso di collagene riempito di collagene-GAG matrice (condroitina-6-solfato). La rigenerazione nervosa è stata esaminata a dodici settimane, valutando il potenziale d'azione muscolare composto, la massima forza tetanica isometrica dell'angolo di contrattura della caviglia e dell'istomorfometria del nervo.

Questo studio clinico è stato effettuato per valutare, oltre la risposta e la funzionalità del condotto nervoso in confronto all'autoinnesto, l'ipotesi che fornire un'imitazione sintetica della lamina basale delle cellule di Schwann sotto forma di una matrice di collagene-glicosaminoglicano (GAG) migliorerebbe il collegamento del gap nervoso e il recupero motorio funzionale.

L'uso dell'autotrapianto ha portato a un recupero motorio significativamente migliore rispetto agli altri metodi sperimentali. Il condotto riempito con matrice di collagene-GAG ha dimostrato risultati superiori rispetto al condotto vuoto e rispetto a quello riempito con matrice di collagene, relativamente a tutti i parametri sperimentali. La conta degli assoni nel condotto

riempito con matrice di collagene-GAG non era significativamente diversa da quella dell'autotrapianto, a dodici settimane dall'intervento.

Questo studio ha evidenziato che l'uso di un condotto nervoso riempito con matrice di collagene-GAG per colmare un difetto motorio o misto del nervo può comportare un recupero motorio funzionale superiore rispetto al condotto di collagene vuoto disponibile in commercio.

In conclusione è quindi stato possibile affermare che l'aggiunta della matrice della lamina basale di collagene sintetico con condroitina-6-solfato nel lume del condotto ha migliorato significativamente il collegamento del gap nervoso e il recupero motorio funzionale.

5.5 *Confronto della rigenerazione prodotta attraverso autotrapianti, allotrapianti Axogen e condotti a base di collagene.*

G. Giusti et al. (2012) hanno effettuato questo studio comparativo intitolato: *“Return of motor function after segmental nerve loss in a rat model: comparison of autogenous nerve graft, collagen conduit, and processed allograft (AxoGen)”*.

Sessantacinque ratti Lewis sono stati divisi in tre gruppi sperimentali. In ciascun gruppo, un difetto del nervo sciatico unilaterale di 10 mm è stato riparato con autotrapianto di nervo, allotrapianto trattato da AxoGen Laboratories o con condotto di collagene di 2,0 mm di diametro interno. Gli animali sono stati studiati a dodici e sedici settimane dopo l'intervento. La valutazione includeva la misurazione bilaterale della forza del muscolo tibiale anteriore e del peso muscolare, l'elettrofisiologia e l'istomorfometria del nervo peroneo. I risultati sono stati espressi come percentuale dei valori rilevati rispetto ai valori del controlaterale assunto come standard. Per l'indagine statistica è stata utilizzata l'analisi della varianza (ANOVA) a due vie corretta dal test a intervalli multipli di Ryan-Einot-Gabriel-Welsch.

I risultati, valutati dopo dodici e sedici settimane, stimando la forza muscolare media (e la deviazione standard) rispetto a quella sul lato controlaterale (di controllo) fornendo i seguenti risultati:

	12 settimane	16 settimane
Autotrapianto	45,2% ± 15,0%	65,5% ± 14,1%
Allotrapianto	43,4% ± 18,0%	36,3% ± 15,7%
Condotto di collagene	7,0% ± 9,2%	12,1% ± 16,0%

A seguito di questi risultati possiamo affermare che l'uso dell'autotrapianto ha comportato nei ratti un migliore recupero motorio rispetto all'uso dell'allograpianto o del condotto di collagene per un breve *gap* nervoso.

Si può però affermare che anche le altre due tecniche hanno offerto risultati considerevoli e vale la pena continuare la sperimentazione di questi prodotti, anche in considerazione che, con un tempo di valutazione più lungo di sedici settimane, sarebbe possibile ottenere risultati migliori, avendo oltre le sedici settimane osservato un recupero muscolare più sostanziale.

5.6 *Confronto tra neuroguide realizzate in alcol polivinilico ossidato e una membrana naturale di leucociti-fibrina-piastrine.*

È qui riportata la ricerca di E. Stocco et al. intitolata: “*New bioresorbable wraps based on oxidized polyvinyl alcohol and leukocyte-fibrin-platelet membrane to support peripheral nerve neurorrhaphy: preclinical comparison versus NeuraWrap*”.

Lo scopo di questo studio preclinico era valutare l'efficacia di due nuovi involucri biodegradabili, costituiti da alcol polivinilico ossidato sintetico all'1% (OxPVA) e una membrana naturale di leucociti-fibrina-piastrine (LFPm) come alternativa al prodotto commerciale NeuraWrap (Integra LifeSciencesCorp, degradazione 36–48 mesi; diametro 3–10 mm; lunghezza 2–4 cm).

Gli innesti sono stati confrontati in base alle caratteristiche strutturali, mediante analisi istologiche e immunohistochimiche e alle caratteristiche ultrastrutturali, mediante microscopia elettronica a trasmissione (TEM). È stato inoltre eseguito uno studio morfometrico per osservare la distribuzione del collagene mediante microscopia di seconda generazione armonica (M2H, basata sull'effetto ottico GSH). Dopo 12 settimane dall'impianto, tutti gli involucri hanno assicurato il recupero della funzione nervosa e non era visibile né tessuto cicatriziale né neuroma alla dissezione.

Secondo i risultati raccolti, tutti i materiali hanno mostrato adeguate proprietà di manipolazione. Erano facili da dimensionare in base all'area del difetto, riconosciuti idonei per l'impianto in posizioni diverse, senza problemi di adattamento al diametro nervoso.

La biodegradabilità elimina inoltre la necessità di un secondo intervento chirurgico di rimozione, il che è un aspetto clinico importante da considerare sia per il chirurgo che per il paziente. Gli involucri LFPm sono stati completamente riassorbiti, mentre sono stati osservati

residui di OxPVA. In entrambi i gruppi la biocompatibilità è stata confermata dall'assenza di un significativo infiltrato infiammatorio.

Secondo l'analisi istologica/immunoistochimica e i risultati morfometrici gli involucri di OxPVA e LFPm erano entrambi efficaci nel preservare l'integrità del nervo.

L'analisi morfometrica, compreso il conteggio delle fibre nervose rigenerate, rimane ancora il metodo più frequentemente utilizzato per misurare l'esito. Gli involucri a base di OxPVA garantiscono un'area fascicolare significativamente più alta rispetto a NeuraWrap sia a livello prossimale che distale.

Parallelamente, i nervi trattati con OxPVA hanno anche mostrato un numero totale di assoni nel moncone distale più elevato, nonostante una densità di assoni simile. Questi risultati incoraggianti convalidano ulteriormente il potenziale di OxPVA come materiale utilizzabile nel recupero dei nervi, ad esempio per la produzione di condotti nervosi e bendaggi, implementando, con esito positivo, le evidenze precliniche precedentemente raccolte.

Per quanto riguarda LFPm, il processo di guarigione ha generato nervi con un'area della sezione trasversale totale più elevata sia a livello prossimale che distale rispetto a NeuraWrap. Le fibre di fibrina e i fattori di crescita supportano la guarigione dei tessuti soprattutto subito dopo l'impianto, rimanendo tuttavia nel sito di sutura per un periodo limitato, esercitano una funzione meccanica ridotta rispetto a NeuraWrap. Ciò nonostante nei due monconi sono stati osservati valori comparabili di area fascicolare, densità di assoni e numero totale di assoni con il prodotto commerciale NeuraWrap, evidenziando un comportamento simile e risultati positivi nella conservazione delle fibre nervose.

Gli involucri a base di OxPVA e LFPm hanno entrambi dimostrato di sostenere la rigenerazione/riparazione dei nervi periferici dopo un taglio acuto, come dimostrato dalle analisi strutturali e morfometriche sopra evidenziate. Non è stata osservata infiltrazione infiammatoria né formazione di tessuto cicatriziale in corrispondenza, o in prossimità, del sito di impianto. Anche l'analisi funzionale ha mostrato un risultato paragonabile a quello del NeuraWrap.

Questi risultati indicano che gli involucri OxPVA e LFPm bioingegnerizzati garantiscono un recupero favorevole della lesione neurale e, in futuro, possono essere considerati un'interessante alternativa al NeuraWrap commerciale.

Risultato fondamentale in quanto i prodotti NeuraWrap sono molto dispendiosi, dato il costo elevato della lavorazione del collagene; al contrario il processo produttivo per ottenere OxPVA

e LFPm è più semplice e privo di problematiche di rischio biologico. Inoltre, per quanto riguarda i bendaggi LFPm, possono essere preparati anche in via estemporanea, a seconda delle esigenze del paziente.

5.7 Studio dell'utilizzo di microcanali per produrre materiali biomimetici funzionali per la realizzazione di neuroguide

Questa ricerca effettuata da J. Wang et al. è intitolata: “*Biomimetic and hierarchical nerve conduits from multifunctional nanofibers for guided peripheral nerve regeneration*”.

Nello studio è stata adottata una strategia multiscala per fabbricare un condotto nervoso biomimetico 3D dalla fibroina di seta di *Antheraea pernyi* (Ap F) funzionalizzato con ossido di grafene. I condotti risultanti mostrano multicanali paralleli, con diametro di 125 μm , circondati da frammenti fibrosi biomimetici con velocità di degradazione appropriata e proprietà meccaniche migliorate rispetto allo scaffold senza ossido di grafene. Studi in vitro hanno comprovato che tali scaffold nervosi biomimetici 3D avevano la capacità di offrire un'interfaccia guida efficace per la crescita delle cellule neuronali. Questi condotti hanno mostrato inoltre una somiglianza con gli autoinnesti in vivo per riparare i difetti del nervo sciatico sulla base di una serie di analisi (camminata, peso del tricipite, morfogenesi, vascolarizzazione, ricrescita assonale e mielinizzazione). I condotti si sono quasi completamente degradati entro 12 settimane rispettando il criterio di biodegradabilità.

Questi risultati dimostrano che tale condotto ha un grande potenziale per la riparazione dei nervi periferici.

Il condotto di guida con microcanali paralleli è stato preparato seguendo queste procedure:

- elettrofilatura per fabbricare nanofibre;
- frammentazione e dispersione di nanofibre;
- colata di sospensione di nanofibre frammentata nello stampo multicanale;
- liofilizzazione e reticolazione.

L'uso di nanofibre polyblend di ApF, per fabbricare i condotti biomimetici, ha prodotto la bioattività desiderata con elevata porosità e micropori/microcanali interconnessi, favorendo la migrazione e la crescita cellulare, la maturazione cellulare e promuovendo la rigenerazione dei nervi. Le nanofibre hanno mostrato una somiglianza morfologica con la matrice del perineurio producendo ottimi risultati, paragonabili agli autoinnesti.

5.8 Studio dell'utilizzo delle proteine della soia per la rigenerazione neurale.

In questo lavoro pubblicato da Q. Zhang et al. intitolato: “*Aligned soy protein isolate-modified poly(L-lactic acid) nanofibrous conduits enhanced peripheral nerve regeneration*” è stato fabbricato un nuovo condotto nanofibroso in poli(L-lattico) (PLLA) con isolato proteico di soia (SPI) per la rigenerazione dei nervi. È stato osservato che SPI potrebbe modificare in modo efficiente il PLLA, lavorabile tramite elettrofilatura, migliorando le proprietà fisiche e biologiche. L'incorporazione di SPI in PLLA/SPI (denominato PSNF), ha ridotto il diametro della fibra e la duttilità dei film nanofibrosi, ha migliorato la resistenza alla trazione, la bagnabilità superficiale e ha aumentato i tempi di degradazione in vivo dei PSNF. Quando il rapporto ibrido di SPI era del 20%, o del 40%, i PSNF potevano favorire in maniera efficace l'estensione e la differenziazione delle cellule neurali in vitro. Sulla base di questi dati sono state eseguite ulteriori indagini con il 20% di SPI (PSNF-20). PSNF-20 con diversi orientamenti delle fibre (rispettivamente orientamento casuale, medio e ordinato) sono stati sviluppati e utilizzati per valutare i comportamenti delle cellule neurali sui materiali. I risultati hanno rivelato che il PSNF-20 con nanofibre altamente orientate (HO-PSNF-20) o nanofibre mediamente orientate (MO-PSNF-20) ha mostrato prestazioni migliori nel dirigere l'estensione cellulare e nel migliorare la crescita dei neuriti. Infine, i condotti di nanofibre altamente orientati (HO-PSNC-20) sono stati utilizzati per colmare il difetto del nervo sciatico nei ratti, paragonando i risultati ottenuti con i dati del trattamento con PLLA altamente orientato e con autoinnesti.

Durante questo studio i condotti nervosi sono stati modificati con segnali biochimici mediante fusione di SPI e con segnali topografici mediante elettrofilatura altamente orientata. Le due strategie, combinate insieme, potrebbero migliorare l'idrofilia e la biodegradabilità dei biomateriali e promuovere la crescita, la diffusione e l'estensione dei neuriti in vitro nonché favorire la rigenerazione dei nervi in vivo. Ulteriormente HO-PSNC-20 ha mostrato un'elevata capacità nella rigenerazione dei nervi e nella ricostruzione funzionale rispetto al PLLA altamente orientato.

Questo studio offre un nuovo e promettente condotto guida per la riparazione e la rigenerazione dei nervi, offrendo valide premesse per trovare un sostituto alla tecnica gold-standard dell'autotrapianto.

Conclusioni

La lesione del nervo periferico è un problema che colpisce milioni di persone in tutto il mondo, con conseguenze che possono portare, nei casi più gravi, a una disabilità irreversibile.

La tecnica ad oggi più utilizzata per ristabilire la continuità del tessuto nervoso nei casi di trattamento delle lesioni nervose acute da taglio, con scarsa o assente perdita di sostanza, è la sutura *end-to-end*, la quale prevede l'accostamento dei due monconi per mezzo di una sutura termino-terminale (neurorrafia).

Questa tecnica spesso porta però a reazioni infiammatorie indesiderate e alla formazione di tessuto cicatriziale lungo la linea di sutura, ostacolando la rigenerazione assonale, producendo un tessuto non lineare, disorganizzato e portando alla formazione di neuromi.

Attualmente il trattamento *gold standard* per la rigenerazione di grandi lacune nervose con perdita di tessuto neurale prevede l'utilizzo di innesti nervosi autologhi con i quali si riscontrano però numerose controindicazioni ed effetti collaterali.

Per superare i limiti della procedura dell'autoinnesto, come alternativa più efficiente per la "restitutio ad integrum" del nervo lesionato, si è indirizzata la ricerca verso lo sviluppo di neuroguide per la rigenerazione nervosa.

Ciò che risulta più interessante nell'applicazione di questi dispositivi è la possibilità di offrire una prospettiva terapeutica alternativa, ad esempio nel trattamento di pazienti anziani (casi non rari), nei quali un trattamento come l'autoinnesto non risulta indicato e dove la sutura *end-to-end* produrrebbe risultati insoddisfacenti.

Larga parte della letteratura suggerisce che le neuroguide debbano possedere una struttura biocompatibile e biorisorbibile, tale da supportare gli assoni in crescita e le cellule associate, e capaci di replicare il microambiente del nervo periferico.

Alle neuroguide artificiali è richiesto di orientare la rigenerazione assonale lungo una struttura longitudinale in presenza di fattori di crescita neurotrofici, applicabili localmente o concentrati in aree specifiche nel lume del condotto.

Le nano tecnologie hanno apportato un contributo essenziale nello sviluppo di questa tecnologia, implementando le tecniche di produzione di questi condotti. Tali tecnologie hanno infatti permesso di realizzare morfologie più complesse in grado di minimizzare l'infiltrazione fibroblastica dall'esterno e, allo stesso tempo, possedere un certo grado di porosità al fine di

permettere la migrazione e la colonizzazione delle cellule all'interno. L'inclusione di cellule esogene per migliorare il recupero del nervo ha, inoltre, riscosso un notevole interesse negli ultimi anni, mostrando risultati promettenti.

Alcuni di questi dispositivi, inclusi quelli realizzati con polimeri naturali e sintetici, hanno iniziato a ricevere l'approvazione della FDA (Food and Drug Administration). Sfortunatamente, ad oggi, nessuno di questi dispositivi ha tutte le caratteristiche auspicabili per ottenere risultati migliori, poiché presentano una riparazione limitata per fessure superiori a 30 mm sia dal punto di vista morfologico che funzionale.

Sintetizzando, secondo la letteratura scientifica, i materiali polimerici a matrice composita naturale e sintetica sembrano essere una soluzione affidabile per preparare tali condotti nervosi. Le loro proprietà possono essere infatti facilmente modificate e consentono, tra le altre cose, l'incorporazione di fattori di crescita nervosa e di cellule accessorie. Queste svolgono un ruolo fondamentale nella corretta rigenerazione del nervo danneggiato, permettendo di ottenere le proprietà meccaniche richieste.

Non è inverosimile pronosticare che la chirurgia dei nervi periferici potrà ampliare le proprie prospettive favorendo lo sviluppo di questa procedura grazie al perfezionarsi di questi dispositivi.

Già ad oggi si evince da studi scientifici il fatto che esse riducano drasticamente lo svilupparsi di neuromi dolorosi, benché non siano ancora conclusi studi clinici comparativi che lo dimostrino in modo univoco.

Per queste tecnologie è comunque ancora necessario un lungo e appropriato studio, al fine di permettere il superamento degli attuali limiti, soprattutto per ciò che riguarda la lunghezza della lacuna da rigenerare.

Bibliografia e sitologia

1. M. Aslam, M. A. Kalyar, Z. A. Raza; *Polyvinyl alcohol: A review of research status and use of polyvinyl alcohol based nanocomposites*. Polymer Engineering & Science, 58(12), 2119-2132.
2. Q. Zhang et al.; *Aligned soy protein isolate-modified poly(L-lactic acid) nanofibrous conduits enhanced peripheral nerve regeneration*. Journal of neural engineering, 17(3), 036003. <https://doi.org/10.1088/1741-2552/ab8d81>.
3. S. Yi et al.; *Application of stem cells in peripheral nerve regeneration*, Burns & Trauma, volume 8, 2020.
4. J. Wang et al.; *Biomimetic and hierarchical nerve conduits from multifunctional nanofibers for guided peripheral nerve regeneration*. Acta biomaterialia, 117, 180–191. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.09.037>.
5. J. B. Silva et al.; *Comparison of nerve conduits and nerve graft in digital nerve regeneration: A systematic review and meta-analysis*. Hand surgery & rehabilitation, 40(6), 715–721. <https://doi.org/10.1016/j.hansur.2021.08.006>.
6. A. Merolli, et al.; *Peripheral nerve regeneration by artificial nerve-guides: research and clinic*. In Biomaterials in hand surgery (pp. 127-143). Springer, Milano (2009).
7. Q. Quan et al.; *Aligned fibers enhance nerve guide conduits when bridging peripheral nerve defects focused on early repair stage*. Neural regeneration research, 14(5), 903–912. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.249239>.
8. T. Zheng et al.; *Composite Topography Scaffolds for Accelerating Long-Distance Peripheral Nerve Regeneration*. Composites Part B: Engineering, 246, 110242.
9. F. Kawai, X. Hu; *Biochemistry of microbial polyvinyl alcohol degradation*. Applied microbiology and biotechnology, 84(2), 227–237. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2113-6>.
10. S. Vijayavenkataraman et al.; *Electrohydrodynamic Jet 3D Printed Nerve Guide Conduits (NGCs) for Peripheral Nerve Injury Repair*. (2018) Polymers, 10(7), 753. <https://doi.org/10.3390/polym10070753>.
11. A. F. Quigley, et al.; *Engineering a multimodal nerve conduit for repair of injured peripheral nerve*. Journal of neural engineering, 10(1), 016008. <https://doi.org/10.1088/1741-2560/10/1/016008>.

12. H. C. Ni et al.; *Fabrication of bioactive conduits containing the fibroblast growth factor 1 and neural stem cells for peripheral nerve regeneration across a 15 mm critical gap*. *Biofabrication*, 5(3), (2013) 035010. <https://doi.org/10.1088/1758-5082/5/3/035010>.
13. S. Kehoe, X. F. Zhang, D. Boyd; *FDA approved guidance conduits and wraps for peripheral nerve injury: a review of materials and efficacy*. *Injury*, 43(5), 553–572. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2010.12.030>.
14. F. Berthiaume, T. J. Maguire, M. L. Yarmush; *Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress, and challenges*. *Annual review of chemical and biomolecular engineering*, 2, 403–430. <https://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-061010-114257>.
15. M. J. Moorea et al.; *Multiple-channel scaffolds to promote spinal cord axon regeneration*. *Biomaterials*, Volume 27, Issue 3, 2006, Pages 419-429.
16. E. Stocco et al.; *New bioresorbable wraps based on oxidized polyvinyl alcohol and leukocyte-fibrin-platelet membrane to support peripheral nerve neurorrhaphy: preclinical comparison versus NeuraWrap*. *Sci Rep* 9, 17193, 20 novembre 2019.
17. M. Szykaruk et al.; *Tissue Engineering: Experimental and Clinical Evidence for Use of Decellularized Nerve Allografts in Peripheral Nerve Gap Reconstruction*. *Tissue engineering. Part B, Reviews*, 19(1), 83–96. <https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2012.0275>.
18. A. C. Pinho et al.; *Peripheral Nerve Regeneration: Current Status and New Strategies Using Polymeric Materials*. *Advanced healthcare materials*, 5(21), 2732–2744. <https://doi.org/10.1002/adhm.201600236>.
19. F. F. A. Ijpma, R. C. Van De Graaf and M. F. Meek; *The early history of tubulation in nerve repair*. *The Journal of hand surgery, European volume*, 33(5), 581–586. <https://doi.org/10.1177/1753193408091349>.
20. Y. Kim, V. K. Haftel, S. Kumar, R. V. Bellamkonda; *The role of aligned polymer fiber-based constructs in the bridging of long peripheral nerve gaps*. *Biomaterials*, Volume 29, Issue 21, 2008, Pages 3117-3127.
21. N. U. Kang, S. J. Lee and S. J. Gwak; *Fabrication Techniques of Nerve Guidance Conduits for Nerve Regeneration*. *Yonsei medical journal*, 63(2), 114–123. <https://doi.org/10.3349/ymj.2022.63.2.114>.

22. E. Biazar et al.; *Types of neural guides and using nanotechnology for peripheral nerve reconstruction*. (2010) International journal of nanomedicine, 5, 839–852.
<https://doi.org/10.2147/IJN.S11883>.
23. J. A. Kouyoumdjian; *Peripheral nerve injuries: A retrospective survey of 456 cases*. Muscle & nerve, 34(6), 785–788. <https://doi.org/10.1002/mus.20624>.
24. S. Vasudevan et al.; *Detergentfree Decellularized Nerve Grafts for Long-gap Peripheral Nerve Reconstruction*. Plastic and reconstructive surgery. Global open, 2(8), e201, (2014).
<https://doi.org/10.1097/GOX.0000000000000118>.
25. G. Lanni, A. Penza, U. Passaretti; *La riparazione delle lesioni nervose periferiche con tubulizzazione sintetica: Nostra esperienza*. Riv Chir Mano - Vol. 43 (3) 2006.
26. B. Battiston; *Il danno nervoso periferico: terapia chirurgica*.
27. N. Rbia et al. (2019); *Collagen Nerve Conduits and Processed Nerve Allografts for the Reconstruction of Digital Nerve Gaps: A Single-Institution Case Series and Review of the Literature*. World neurosurgery, 127, e1176–e1184.
<https://doi.org/10.1016/j.wneu.2019.04.087>
28. Lee, J. Y. Lee et al. (2012); *The effect of collagen nerve conduits filled with collagen-glycosaminoglycan matrix on peripheral motor nerve regeneration in a rat model*. JBJS, 94(22), 2084-2091.
29. G. Giusti et al. (2012); *Return of motor function after segmental nerve loss in a rat model: comparison of autogenous nerve graft, collagen conduit, and processed allograft (AxoGen)*. The Journal of bone and joint surgery. American volume, 94(5), 410–417.
<https://doi.org/10.2106/JBJS.K.00253>
30. <https://www.humanitas.it/enciclopedia/anatomia/sistema-nervoso>
31. <https://www.humanitas.it/enciclopedia/anatomia/sistema-nervoso/sistema-nervoso-periferico>
32. <https://cordis.europa.eu/article/id/173629-regenerative-scaffolds-for-the-central-nervous-system/it>
33. <https://www.nico.ottolenghi.unito.it/Ricerca/News-ricerca/Rigenerazione-dei-nervi-svelato-il-percorso-delle-cellule-di-Schwann-per-colonizzare-i-condotti-nervosi>
34. <https://www.integranerve.com/nerve-guide>

35. <https://www.integranerve.com/nerve-protector>
36. <https://www.centrodinoferrari.com/patologie/lesioni-nervose/#:~:text=Le%20lesioni%20dei%20nervi%20periferici,o%20guide%20di%20collagene%20riassorbibili.>
37. <https://www.nico.ottolenghi.unito.it/Ricerca/News-ricerca/Lesioni-dei-nervi-periferici-individuato-il-fattore-che-puo-limitare-la-rigenerazione-nervosa>
38. <https://cordis.europa.eu/article/id/156595-mechanisms-of-nerve-regeneration/it>
39. <https://www.ingegneriabiomedica.org/news/neuroscience/cellule-nervose-impiantabili-studio-scaffold-uso-neuronale-nuovi-scenari/>