



# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Dottorato di ricerca in Scienze Molecolari e Biomolecolari

Curriculum: “Tecnologie delle Sostanze Biologicamente Attive”

Dipartimento Scienze e Tecnologie Biologiche Chimiche e Farmaceutiche (STEBICEF)

SSD CHIM/09

Nuovi biomateriali a struttura polisaccaridica  
per potenziali applicazioni in medicina rigenerativa

IL DOTTORE  
**STEFANO AGNELLO**

IL COORDINATORE  
**CH.MA PROF.SSA PATRIZIA DIANA**

IL TUTOR  
**CH.MA PROF.SSA GIOVANNA PITARRESI**

CICLO XXIX  
ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO 2017

# Indice

<b>1. Introduzione</b>	<b>pag.1</b>
1.1 Ingegneria tissutale e medicina rigenerativa	pag.1
1.2 Caratteristiche dei sistemi tridimensionali per applicazioni in TERM	pag.4
1.3 Principali tecniche per la fabbricazione di <i>device</i> 3D per applicazioni in TERM	pag.8
1.3.1 Caratteristiche e principali tecniche di produzione di <i>hydrogel</i> e spugne porose	pag.9
1.3.2 Caratteristiche e principali tecniche di produzione di <i>scaffold</i> fibrosi	pag.14
1.3.3 Caratteristiche e principali tecniche di produzione di microparticelle per applicazioni in TERM	pag.22
1.4 Modifiche superficiali dei sistemi 3D utilizzati in TERM	pag.31
1.5 Materiali polimerici di natura polisaccaridica per applicazioni in TERM	pag.39
1.5.1 Acido ialuronico	pag.42
1.5.2 Gellan gum	pag.45
<b>2. Scopo della tesi</b>	<b>pag.48</b>
<b>3. Risultati e discussioni</b>	<b>pag.57</b>
3.1 Sintesi e caratterizzazione del polimero HA-EDA-C <sub>18</sub>	pag.57
3.2 Spugne porose di HA-EDA-C <sub>18</sub>	pag.58
3.2.1 Produzione di spugne porose di HA-EDA-C <sub>18</sub>	pag.58
3.2.2 Caratterizzazione delle spugne di HA-EDA-C <sub>18</sub>	pag.60
3.2.3 Sintesi del derivato MLB-NHS	pag.63
3.2.4 Valutazione qualitativa del <i>grafting</i> di MLB-NHS e di cy-RGDC su un film bidimensionale di HA-EDA-C <sub>18</sub>	pag.65
3.2.5 Studi di adesione cellulare condotti su film di HA-EDA-C <sub>18</sub> -cyRGDC	pag.67

3.2.6	<i>Grafting</i> del derivato MLB-NHS e del cy-RGDC sulle spugne di HA-EDA-C <sub>18</sub>	pag.69
3.2.7	Caricamento del desametasone nelle spugne di HA-EDA-C <sub>18</sub> e HA-EDA-C <sub>18</sub> -cyRGDC e studi di rilascio	pag.71
3.2.8	Coltivazione in vitro di condrociti bovini su spugne di HA-EDA-C <sub>18</sub> e HA-EDA-C <sub>18</sub> -cyRGDC	pag.73
3.2.9	Studi di istologia e immunoistochimica sulle spugne di HA-EDA-C <sub>18</sub> e HA-EDA-C <sub>18</sub> -cyRGDC	pag.76
3.3	Microfibre di HA-EDA-C <sub>18</sub>	pag.77
3.3.1	Tecnica di produzione delle microfibre di HA-EDA-C <sub>18</sub>	pag.77
3.3.2	Caratterizzazione e studio qualitativo della stabilità delle microfibre di HA-EDA-C <sub>18</sub>	pag.78
3.3.3	Studi di rilascio dalle microfibre di HA-EDA-C <sub>18</sub> caricate con desametasone	pag.80
3.4	Microparticelle di HA-EDA-C <sub>18</sub>	pag.82
3.4.1	Produzione di microparticelle di HA-EDA-C <sub>18</sub>	pag.82
3.4.2	Caratterizzazione delle microparticelle di HA-EDA-C <sub>18</sub>	pag.84
3.4.3	Produzione di microparticelle di HA-EDA-C <sub>18</sub> caricate con desametasone e studi di rilascio	pag.88
3.4.4	Funzionalizzazione delle microparticelle di HA-EDA-C <sub>18</sub> con cy-RGDC e TGF-β3	pag.90
3.4.5	Analisi XPS sulle microparticelle	pag.94
3.4.6	Studi di adesione e formazione degli aggregati BM-hMSC/microparticelle di HA-EDA-C <sub>18</sub>	pag.96
3.4.7	Coltura degli aggregati BM-hMSC/microparticelle di HA-EDA-C <sub>18</sub>	pag.98
3.4.8	Analisi istologica	pag.102
3.5	Microparticelle di HA-EDA-C <sub>18</sub> reticolate chimicamente	pag.105
3.5.1	Produzione delle microparticelle di HA-EDA-C <sub>18</sub>	pag.105
3.5.2	Procedura di reticolazione chimica delle microparticelle di HA-EDA-C <sub>18</sub>	pag.106
3.5.3	Formazione degli aggregati BM-hMSC/microparticelle di HA-EDA-C <sub>18</sub> reticolate chimicamente	pag.110
3.5.4	Studio reologico sugli aggregati BM-hMSC/microparticelle di HA-EDA-C <sub>18</sub>	pag.112
3.6	Preparazione e caratterizzazione di <i>hydrogel</i> di nuovi derivati del gellan gum	pag.114
3.6.1	Derivatizzazione del gellan gum con ottadecilammina	pag.114

3.6.2	Analisi termo-reologica	pag.119
3.6.3	Caratterizzazione degli <i>hydrogel</i>	pag.123
3.6.3.1	Studi di <i>swelling</i>	pag.123
3.6.3.2	Studio delle proprietà meccaniche degli <i>hydrogel</i>	pag.124
3.6.3.3	Studio della stabilità degli <i>hydrogel</i>	pag.126

#### **4. Conclusioni** **pag.129**

### **5. Parte sperimentale** **pag.134**

#### 5.1 Materiali pag.134

#### 5.2 Metodi pag.136

#### 5.3 Sintesi del polimero HA-EDA-C<sub>18</sub> pag.139

#### 5.4 Spugne porose di HA-EDA-C<sub>18</sub> pag.141

5.4.1	Produzione di spugne porose di HA-EDA-C <sub>18</sub>	pag.141
5.4.2	Caratterizzazione delle spugne di HA-EDA-C <sub>18</sub>	pag.141
5.4.3	Sintesi del derivato MLB-NHS	pag.143
5.4.4	Valutazione qualitativa del <i>grafting</i> di MLB-NHS e di cy-RGDC su un film bidimensionale di HA-EDA-C <sub>18</sub>	pag.144
5.4.5	Studi di adesione cellulare condotti su film di HA-EDA-C <sub>18</sub> -cyRGDC	pag.145
5.4.6	<i>Grafting</i> del derivato MLB-NHS e del cy-RGDC sulle spugne di HA-EDA-C <sub>18</sub>	pag.147
5.4.7	Caricamento del desametasone nelle spugne di HA-EDA-C <sub>18</sub> e HA-EDA-C <sub>18</sub> -cyRGDC e studi di rilascio	pag.148
5.4.8	Coltivazione in vitro di condrociti bovini su spugne di HA-EDA-C <sub>18</sub> e HA-EDA-C <sub>18</sub> -cyRGDC	pag.150
5.4.9	Studi di istologia e immunoistochimica sulle spugne di HA-EDA-C <sub>18</sub> e HA-EDA-C <sub>18</sub> -cyRGDC	pag.151

#### 5.5 Microfibre di HA-EDA-C<sub>18</sub> pag.152

5.5.1	Tecnica di produzione delle microfibre di HA-EDA-C <sub>18</sub>	pag.152
5.5.2	Caratterizzazione e studio qualitativo della stabilità delle microfibre di HA-EDA-C <sub>18</sub>	pag.153
5.5.3	Studi di rilascio dalle microfibre di HA-EDA-C <sub>18</sub> caricate con desametasone	pag.153

5.6	Microparticelle di HA-EDA-C <sub>18</sub>	pag.154
5.6.1	Produzione di microparticelle di HA-EDA-C <sub>18</sub>	pag.154
5.6.2	Caratterizzazione delle microparticelle di HA-EDA-C <sub>18</sub>	pag.155
5.6.3	Produzione di microparticelle di HA-EDA-C <sub>18</sub> caricate con desametasone e studi di rilascio	pag.156
5.6.4	Funzionalizzazione delle microparticelle di HA-EDA-C <sub>18</sub> con cy-RGDC e TGF-β <sub>3</sub>	pag.157
5.6.5	Analisi XPS sulle microparticelle	pag.160
5.6.6	Studi di adesione e formazione degli aggregati BM-hMSC/microparticelle di HA-EDA-C <sub>18</sub>	pag.160
5.6.7	Coltura degli aggregati BM-hMSC/microparticelle di HA-EDA-C <sub>18</sub>	pag.161
5.6.8	Analisi istologica	pag.163
5.7	Microparticelle di HA-EDA-C <sub>18</sub> reticolate chimicamente	pag.164
5.7.1	Produzione delle microparticelle di HA-EDA-C <sub>18</sub>	pag.164
5.7.2	Procedura di reticolazione chimica delle microparticelle di HA-EDA-C <sub>18</sub>	pag. 165
5.7.3	Formazione degli aggregati BM-hMSC/microparticelle di HA-EDA-C <sub>18</sub> reticolate chimicamente	pag.168
5.7.4	Studio reologico sugli aggregati BM-hMSC/microparticelle di HA-EDA-C <sub>18</sub>	pag.169
5.8	Preparazione e caratterizzazione di <i>hydrogel</i> di nuovi derivati del gellan gum	pag.170
5.8.1	Derivatizzazione del gellan gum con ottadecilammina	pag.170
5.8.2	Analisi termo-reologica	pag.172
5.8.3	Preparazione degli <i>hydrogel</i>	pag.173
5.8.4	Caratterizzazione degli <i>hydrogel</i>	pag.173
5.8.4.1	Studi di <i>swelling</i>	pag.173
5.8.4.2	Studio delle proprietà meccaniche degli <i>hydrogel</i>	pag.174
5.8.4.3	Studio della stabilità degli <i>hydrogel</i>	pag.174
5.9	Analisi statistica	pag.175

**6. Bibliografia** **pag.176**

# 1. Introduzione

## 1.1 Ingegneria tissutale e medicina rigenerativa

Traumi, malattie ed infortuni possono causare danni e lesioni ai vari tessuti del corpo umano che necessitano quindi di trattamenti terapeutici che facilitino la riparazione, la sostituzione o la rigenerazione del tessuto stesso.

I trattamenti classici si basano sul trapianto di un tessuto, o da un sito all'altro del paziente (“trapianto autologo”) o da un individuo ad un altro (“allograpianto”). Tuttavia entrambe le tecniche presentano dei problemi, infatti il trapianto autologo è costoso, doloroso e vincolato da limiti anatomici; l'allograpianto, invece, presenta rischi di rigetto da parte del sistema immunitario del paziente e la possibilità di infezioni.

La riparazione dei tessuti e degli organi rappresenta quindi tutt'oggi una sfida clinica. L'ingegneria tissutale e la medicina rigenerativa (“*Tissue Engineering and Regenerative Medicine*” TERM) rappresentano delle soluzioni emergenti che si focalizzano sullo sviluppo di nuove terapie per riparare tessuti e organi. [Atala A., 2004; Langer R., 2000; Bonassar L.J. e Vacanti C.A., 1998].

Nel 1993 Langer R. e Vacanti J.P. definirono l'ingegneria tissutale (TE) come “un campo interdisciplinare che applica i principi dell'ingegneria e delle scienze della vita allo scopo di sviluppare sostituti biologici che possono sostituire, mantenere o migliorare la funzione di tessuti o organi

interi” [Langer R. e Vacanti J.P., 1993]. La medicina rigenerativa (RM) invece, è stata definita come “il processo di sostituzione o rigenerazione di cellule umane, tessuti o organi per ristabilire la normale funzione” [Mason C. e Dunnill P., 2008].

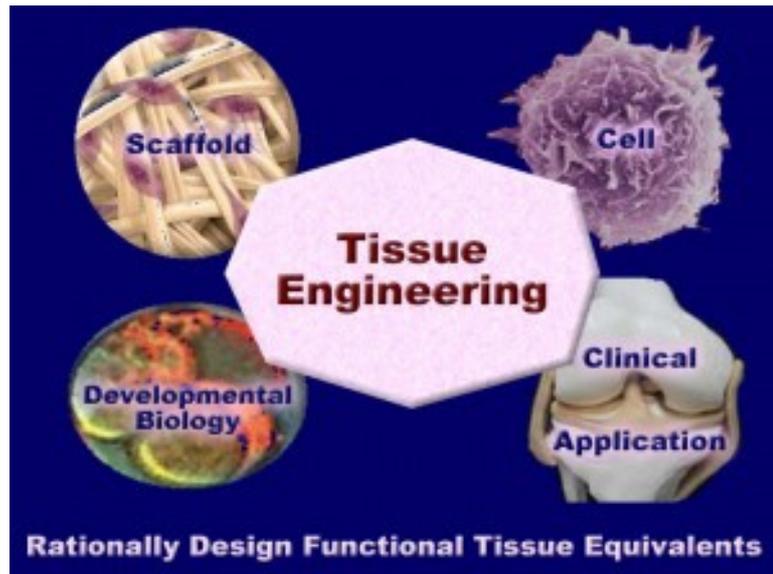
Gli studi di medicina rigenerativa sfruttano delle strategie basate su cellule, terapia genica e sull’ingegneria tissutale stessa. Quindi, poiché i loro obiettivi sono sovrapponibili, i due campi negli ultimi anni sono stati fusi, dando origine al più ampio campo dell’ingegneria tissutale e medicina rigenerativa (TERM).

Sin dai primi approcci, gli studi di ingegneria tissutale sono stati incentrati su tre pilastri fondamentali: *scaffold*, cellule e fattori di crescita [Salgado A.J. et al., 2004].

Le cellule, nel loro ambiente nativo, risiedono in una matrice extracellulare (ECM) tridimensionale costituita da un intreccio proteico complesso e dinamico, caratterizzato da una specifica struttura fisica, integrità meccanica e attività biochimica. Questa matrice fibrosa (formata da collagene, fibrina, elastina, ecc.) fornisce la struttura per l'ancoraggio cellulare e il sequestro di segnali solubili bioattivi [Guvendiren M. e Burdick J.A., 2013]. Alla luce di questa complessa organizzazione i requisiti fondamentali per la produzione di un tessuto bioingegnerizzato artificiale prevedono:

- l’isolamento e la coltura di cellule

- l'ottenimento di biomateriali a partire da macromolecole sintetiche e/o naturali in grado di simulare l'ECM e di poter essere impiantati in vivo (**Fig. 1**).



**Figura 1.** Rappresentazione schematica dei parametri fondamentali per la produzione di un tessuto bioingegnerizzato

Le caratteristiche anatomiche e fisiologiche oltre che chimico-fisiche e meccaniche del tessuto da riparare influenzano la scelta del biomateriale e la specifica tecnica di produzione per ottenere un supporto (*scaffold*) che possa mimare le caratteristiche del tessuto stesso.

## **1.2 Caratteristiche dei sistemi tridimensionali per applicazioni in TERM**

Le nuove scoperte avvenute negli ultimi anni nei differenti campi della biologia hanno dimostrato che le cellule sono molto sensibili all'ambiente che le circonda e che il controllo su di esso è un aspetto fondamentale dell'ingegneria tissutale e della medicina rigenerativa. Il microambiente cellulare può influenzare direttamente una cellula o un gruppo di cellule attraverso fattori biofisici, biochimici o di altro tipo. Inoltre, sono anche presenti molecole e fattori di crescita che hanno il compito di fornire stimoli adatti affinché le cellule siano capaci di mantenere il loro fenotipo e la sintesi o l'espressione delle proteine richieste per la loro specifica funzione tissutale [Goessler U. et al., 2004; Sachlos E. et al., 2003].

I principali fattori del microambiente che influenzano il comportamento cellulare sono:

- la matrice extracellulare (ECM);
- le cellule omotipiche o eterotipiche che circondano la singola cellula;
- le citochine, gli ormoni e gli altri agenti bioattivi presenti attorno alle cellule dovuti alle secrezioni autocrine, endocrine e paracrine;

- la topografia in nano/microscala e le proprietà fisiche delle cellule vicine e dell'ECM;
- le forze meccaniche dovute al movimento dell'organismo o al movimento dei fluidi fisiologici come il sangue.

La relativa importanza di ciascun componente sul comportamento delle cellule dipende dal tessuto e dal tipo di cellula e quindi, la successiva fabbricazione di tessuti bioingegnerizzati, per essere funzionale e costituire una soluzione clinica a lunga durata, deve imitare il più possibile questi fattori. Il microambiente delle cellule staminali ad esempio, costituisce un *topic* particolarmente importante in TERM a causa della maggiore sensibilità alla nicchia fisiologica delle stesse cellule.

Quindi uno *scaffold* biomimetico per l'ingegneria dei tessuti dovrebbe essere costituito da un biomateriale biocompatibile capace di imitare alcune caratteristiche dell'ECM naturale al fine di facilitare il reclutamento/semina delle cellule, l'adesione, la proliferazione, il differenziamento e la neo-genesi del tessuto.

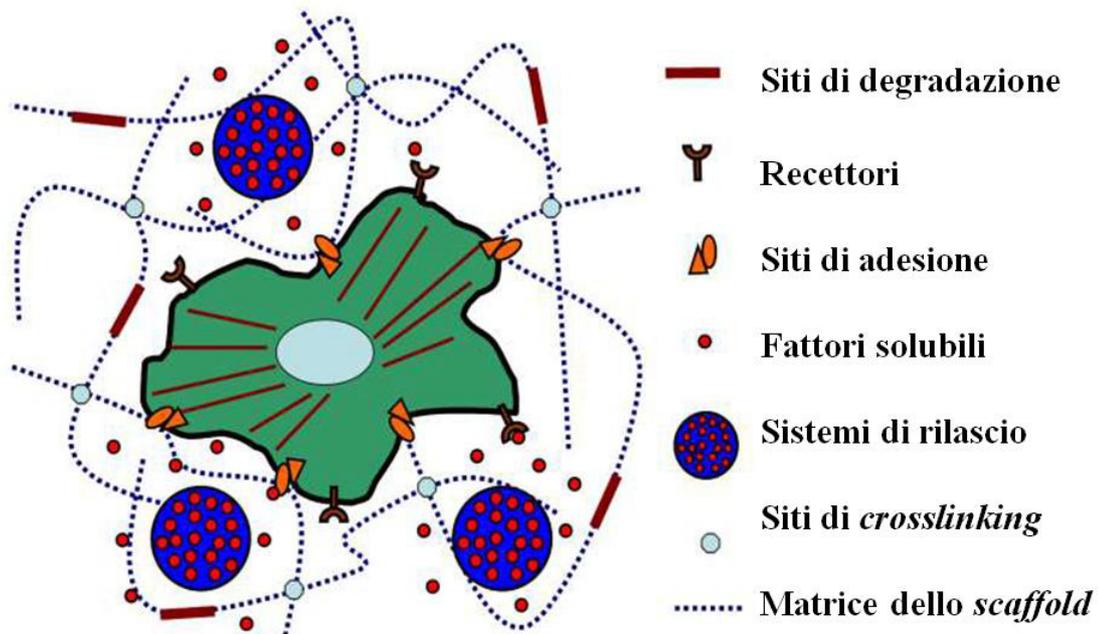
I materiali negli esseri umani vengono impiantati da più di tremila anni [Irish J.D., 2004], ma l'inizio dell'era moderna nel *design* dei biomateriali coincide con gli anni 1960-1970. Durante questo periodo, i ricercatori hanno sviluppato impianti che svolgono funzioni prevalentemente meccaniche cercando di suscitare la minima risposta nell'ospite. Questi materiali "bioinerti" hanno avuto, e hanno ancora, un forte impatto sul trattamento di

alcune malattie. Dal 1980 invece, si è assistito ad una transizione verso la progettazione di biomateriali con attività biologica controllata e, con il successivo avvento della TERM, verso la creazione di materiali complessi e intelligenti che interagiscono con le cellule e che sono in grado di dirigere la loro risposta biologica [Harrison R.H. et al., 2014]. Pertanto, le caratteristiche generali che deve possedere uno *scaffold* per creare una matrice rigenerativa adatta sono:

- una vasta rete di interconnessione tra i pori in modo che le cellule possono migrare, moltiplicarsi e penetrare lo *scaffold* fino all'interno;
- la presenza di canali attraverso i quali ossigeno e nutrienti possono arrivare alle cellule più profonde all'interno dello *scaffold* ed i prodotti di scarto possono essere facilmente eliminati;
- biocompatibilità ed elevata affinità per le cellule che aderiscono e proliferano anche tramite l'incorporazione di ligandi che favoriscono l'adesione delle stesse;
- proprietà biomeccaniche e biochimiche della matrice adatte al tessuto da riparare;
- forma adatta e per quanto complessa come desiderata dal chirurgo per facilitarne il possibile impianto;
- biodegradabilità biomimetica, ovvero che la degradazione dello *scaffold* si accordi con la velocità di formazione del neo-tessuto;

- la possibile aggiunta di morfogeni per reclutare e influenzare la rigenerazione delle cellule competenti, incoraggiarne la proliferazione e controllare la risposta infiammatoria [Ma P.X., 2005].

Inoltre, gli stessi *scaffold* possono essere usati come veicolo per il rilascio di farmaci e/o fattori di crescita, mentre sono simultaneamente usati come matrice per cellule e tessuti in crescita (**Fig.2**).



**Figura 2.** Rappresentazione schematica delle principali caratteristiche di uno *scaffold* per applicazioni in ingegneria tissutale [Burdick J.A. e Vunjak-Novakovic G., 2009; Marklein R.A. e Burdick J.A., 2010]

Le stesse cellule seminate hanno un ruolo importante in quanto potranno agire in molti casi, con le loro molecole prodotte, come impulso biologico endogeno per stimolare la rigenerazione.

Lo scopo pertanto è quello di coltivare cellule e *scaffold* per un lungo periodo di tempo dopo il quale il costrutto cellule-*scaffold* potrà essere impiantato in vivo.

### **1.3 Principali tecniche per la fabbricazione di *device* 3D per applicazioni in TERM**

Lo *scaffold* fornisce il microambiente (matrice extracellulare sintetica temporanea) per le cellule [Ma P.X. e Elisseeff J., 2006; Ma P.X., 2004 e 2005; Liu X. e Ma P.X., 2004] e oltre che dai materiali, la proliferazione cellulare e la formazione del tessuto sono influenzati dalle proprietà fisiche degli *scaffold*, quali la porosità, la rugosità superficiale, l'elasticità e l'architettura tridimensionale [Khademhosseini A. et al., 2006; Cooper J.A., 2005; Vacanti J.P. e Langer R., 1999], come riportato nel paragrafo precedente.

È fondamentale definire quindi la geometria 3D e le caratteristiche meccaniche e fisiche dello *scaffold*. Nell'ultimo decennio, sono stati sviluppati vari metodi di fabbricazione di *scaffold* biomimetici tridimensionali, quali *electrospinning* [Pitarresi G. et al., 2013; Lao L.H. et al., 2011; Chung S.W. et al., 2010; Soliman S. et al., 2010;], *phase-separation* [Budyanto L. et al., 2009; Blaker J.J. et al., 2008], *freeze drying* [Sultana N. e Wang M., 2012; Heijkants R.G.J.C. et al., 2006], *self-assembly* [Peck M. et al., 2011; Nagahama K. et al., 2008], *particulate*

*leaching* [Palumbo F.S. et al., 2015a], microfluidica [Jung J.-H. et al., 2009], emulsione, aggregazione di microparticelle [Custodio C.A. et al., 2015], ecc. Tutti questi metodi possono essere raggruppati in due categorie, la prima prevede l'uso di solventi per la solubilizzazione del materiale, la seconda invece la fusione del materiale stesso [Liu Tsang V. e Bhatia S.N., 2004]. Entrambi i metodi presentano vantaggi e svantaggi nello sviluppo di *device* per applicazioni biomediche. I metodi che si basano sull'uso di solventi richiedono analisi accurate per assicurarsi che non rimanga solvente residuo trattenuto negli *scaffold* dopo la processazione, invece i processi basati sulla fusione, richiedono un controllo sulle temperature usate affinché non si verifichi una degradazione termica durante la processazione dei biomateriali.

### **1.3.1 Caratteristiche e principali tecniche di produzione di *hydrogel* e spugne porose**

Gli *hydrogel* per la medicina rigenerativa sono composti da un *network* di catene polimeriche idrofile che creano una struttura di supporto permettendo l'infiltrazione di cellule e la diffusione di molecole attraverso le maglie del materiale.

Gli *hydrogel* sono i sistemi 3D più studiati grazie alla stretta somiglianza fisico-strutturale ai tessuti molli dovuta, alla loro capacità di trattenere grandi quantità di acqua, alla loro consistenza meccanica nonché alla grande

versatilità per la processazione tecnologica [Seliktar D., 2012; Tibbitt M.W. e Anseth K.S., 2009; Slaughter B.V. et al., 2009]. Gli *hydrogel*, infatti, possono essere ingegnerizzati per somigliare all'ambiente extracellulare dei tessuti umani in modo da permetterne l'uso in campo biomedico anche come biosensori e come sistemi di rilascio di farmaci [Seliktar D., 2012]. Gli *hydrogel* sono in grado di assorbire acqua fino a 1000 volte il loro peso secco e possono essere reticolati tramite reazioni chimiche che portano alla formazione di legami di tipo covalente o assemblati grazie alla formazione di legami di tipo fisico (interazioni ioniche, *self assembling* idrofobico,  $\pi$ - $\pi$  *stacking*, ecc.), permettendo spesso anche l'incapsulamento cellulare [Griffin D.R. e Kasko A.M., 2012; Li Y.L. et al., 2012; Guvendiren M. et al., 2012; Wang C.M. et al., 2010]. Recentemente inoltre sono state sviluppate nuove potenziali applicazioni per gli *hydrogel* "biomedici" soprattutto nel campo di applicazione terapeutica delle cellule staminali, nella diagnostica o nella cura di malattie tumorali, ecc. L'applicazione degli *hydrogel* in campo biomedico, naturalmente rimane subordinata alla reale compatibilità tra le cellule e gli *hydrogel* stessi, nonché alla capacità di questi ultimi di mimare nella maniera più verosimile la complessa matrice extracellulare [Tibbitt M.W. e Anseth K.S., 2009].

Pertanto, allo scopo di utilizzare gli *hydrogel* come sostituti artificiali dell'ECM e direzionare al meglio il comportamento cellulare, la ricerca si è focalizzata sulla loro precisa ingegnerizzazione atta a controllarne le

proprietà fisiche e biologiche, e quindi differenti tecnologie sono state sviluppate per creare *hydrogel* con caratteristiche fisiche e architetture ben definite.

La tecnica del *self-assembly* è generalmente definita come l'organizzazione autonoma, senza l'intervento umano, delle molecole in strutture o modelli ben definiti [Whitesides G.M. e Grzybowski B., 2002]. Tali modelli sono tipicamente formati e mantenuti da legami non-covalenti [Roemer D. et al., 1977]. Un esempio in natura di molecole che rapidamente si auto-organizzano in strutture altamente ordinate, è dato dai fosfolipidi, i quali sono i principali componenti delle membrane cellulari. In soluzioni acquose, i fosfolipidi rapidamente si auto-assemblano formando vescicole, micelle e tubi. Schnur J.M. e suoi collaboratori hanno studiato il *self-assembly* molecolare usando dei lipidi tubulari [Schnur J.M. et al., 1987]. Varie altre molecole sono state utilizzate per il *self-assembly* molecolare. Per imitare la struttura a tripla elica del collagene ad esempio, sono stati sintetizzati da Fields, Tirrell e collaboratori dei peptidi anfifilici (PA) [Yu Y.C. et al., 1999 e 1998; Berndt P. et al., 1995].

Un PA consiste in una sequenza peptidica tipica del collagene, Gly-Val-Lys-Gly-Asp-Lys-Gly-Asn-Pro-Gly-Trp-Pro-Gly-Ala-Pro, connessa come mono o di alchil estere a lunghe catene di lipide. Il peptide di collagene della sequenza di testa forma la struttura a tripla elica, mentre la

regione lipofila di coda si assocerà attraverso interazioni idrofobiche per indurre o stabilizzare la struttura tridimensionale [Yu Y.C. et al., 1999].

Zhang S. e collaboratori hanno creato invece delle strutture self-assemblate usando oligopeptidi ionici complementari [Holmes T.C. et al., 2000]. Questi oligopeptidi contengono in alternanza blocchi di aminoacidi idrofili e idrofobi e in acqua, si organizzano naturalmente in strutture  $\beta$ -sheet stabili. Inoltre, quando esposti a cationi alcalini monovalenti o in condizioni fisiologiche, gli oligopeptidi possono assemblare in idrogeli formando nanofibre intrecciate con diametro compreso tra 10-20 nm [Holmes T.C. et al., 2000; Zhang S. et al., 1993].

Uno dei limiti degli *scaffold* ottenuti tramite la tecnica del *self-assembly* è l'incapacità di controllare la forma dei macropori e di riuscire a formare geometrie 3D stabili meccanicamente con un adeguato profilo di degradazione. Tuttavia, i materiali capaci di auto-assemblare sono molto usati poiché costituiscono *hydrogel* che possono essere inoculati facilmente nel corpo del paziente.

Nelle morfologie 3D, ad esempio, *scaffold* con pori di piccola dimensione si sono rivelati più efficaci nel migliorare la proliferazione cellulare e nel mantenere la corretta diffusione di nutrienti, inoltre, anche la velocità di degradazione è influenzata dalla dimensione degli stessi pori e dalla forma dello *scaffold* [Zong X. et al., 2005; Lee Y.H. et al., 2005]. Quindi, costituisce un parametro importante il controllo della porosità e della

dimensione dei pori.

Tra i metodi più usati per produrre ad esempio spugne a porosità controllata, vi sono quelli basati sul *leaching* di particelle solubili. La tecnica consiste nel miscelare un polimero o una miscela di polimeri con particelle *leachable* (sostanze porogene), la miscela poi è caricata in un *mold* e, o viene scaldata al di sopra della temperatura di transizione vetrosa del polimero oppure compressa per un certo periodo di tempo, con l'obiettivo di massimizzare l'impaccamento. Dopo di ciò, lo stampo composito polimero-porogeno è immerso in un solvente per la dissoluzione selettiva del porogeno. La porosità e la dimensione dei pori dello *scaffold* è controllata dalla quantità e dalle dimensioni del porogeno usato [Correlo V.M. et al., 2009].

Un'altra tecnica molto utilizzata per creare spugne porose è quella del *gas foaming* che ha il notevole vantaggio di eliminare l'utilizzo di solventi organici, infatti in questo caso l'agente porogeno è costituito da un gas.

Il polimero ad esempio, viene saturato con CO<sub>2</sub> ad alta pressione, successivamente si riduce la solubilità del gas nel polimero stesso portando rapidamente la pressione della CO<sub>2</sub> alla pressione atmosferica, ciò comporta la nucleazione e la crescita di bolle gassose nel polimero la cui dimensione varia tra 100 e 500 µm. In una struttura così ottenuta, spesso solo il 10-30 % dei pori risulta connesso.

### **1.3.2 Caratteristiche e principali tecniche di produzione di scaffold fibrosi**

La natura fibrosa dell'ECM naturale ha portato molti ricercatori a focalizzarsi sullo sviluppo di *scaffold* fibrosi che sono stati tra i primi *template* proposti per applicazioni in TERM [Freed L.E. et al., 1993; Mikos A.G. et al., 1993].

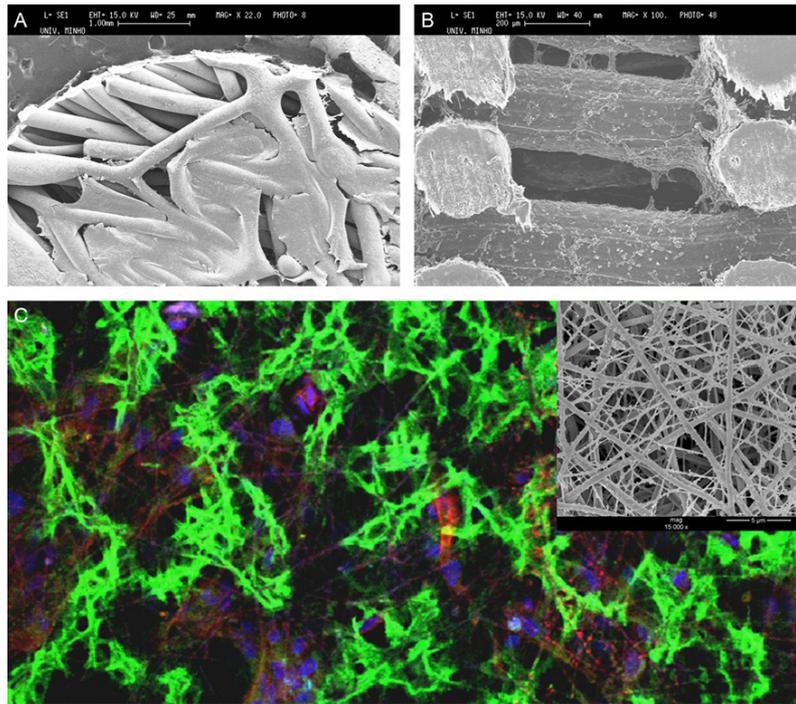
Macroscopicamente, gli *scaffold* fibrosi possono ospitare le cellule seminate e guidare la loro crescita in tessuti strutturati come fibre o strutture tubulari, microscopicamente vanno a mimare la topografia dell'ECM, come ad esempio le fibre di collagene.

Diversi studi riportati in letteratura hanno mostrato che gli *scaffold* costituiti da fibre hanno un'adeguata interconnettività tra i pori e delle proprietà meccaniche tali da poter essere usate per varie applicazioni in ingegneria tissutale [Gomes M.E. et al., 2003 e 2006].

Gli *scaffold* fibrosi possono essere ottenuti attraverso una grande varietà di metodi. Ad esempio attraverso la tecnica del *fiber bonding*, una quantità predefinita di microfibre prodotta dal processo di estrusione è allineata in maniera casuale in un *modal* di teflon personalizzato che viene riscaldato e compresso ad una determinata temperatura per un periodo di tempo stabilito. Questo metodo aiuta a conservare l'arrangiamento spaziale *random* delle fibre e permette che la struttura delle stesse non collassi [Mikos A.G. e Temenoff J.S., 2000].

Controllando la compressione, la quantità e la dimensione delle fibre, è possibile ottenere *scaffold* con differenti morfologie, con diversa porosità e diversa dimensione dei pori [Chung S. et al., 2008]. Il vantaggio principale di questo metodo di processazione è che esso permette di produrre *scaffold* con elevata area superficiale ed elevata interconnettività dei pori, fattori entrambi importanti per l'adesione delle cellule e per la rapida diffusione delle stesse e dei nutrienti.

Diversi studi hanno mostrato inoltre come, *scaffold* formati da *mesh* di fibre a base di chitosano, ottenute attraverso il processo di *fiber bonding*, hanno proprietà strutturali e meccaniche adatte per essere utilizzate per la rigenerazione ossea [Martins A. et al., 2010; Costa-Pinto A.R. et al., 2009] (**Fig. 3A e 3B**) e cartilaginea [Alves da Silva M.L. et al., 2011; Olivera J.T. et al., 2011].



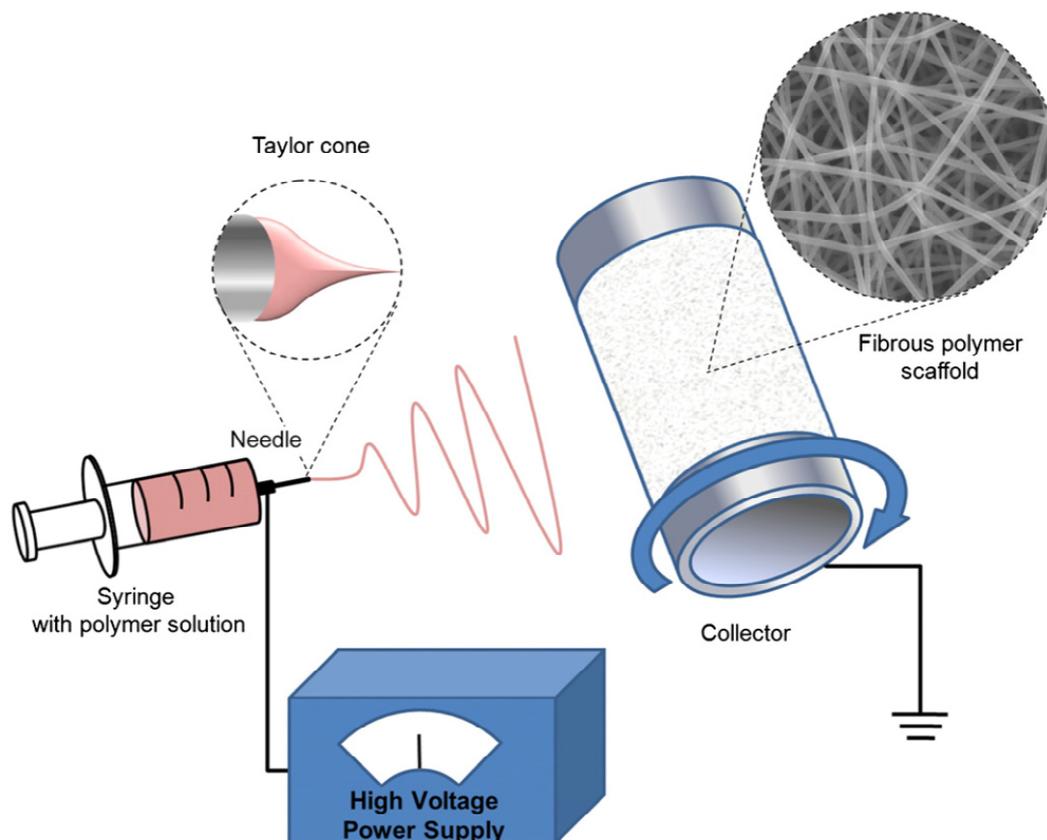
**Figura 3.** Cellule umane staminali mesenchimali Wharton's Jelly-derived coltivate su uno *scaffold* fibroso (A); cellule staminali mesenchimali di midollo osseo umano coltivate sulle maglie di uno *scaffold* microfibrillare (B); condrociti umani coltivate su nanofibre di poliprolattone funzionalizzato con condroitinsolfato (C)

L'*electrospinning* è una tecnica che esiste in letteratura da più di 100 anni [Morton W.J., 1902]. È stata utilizzata per produrre prodotti fibrosi non intrecciati per usi industriali e casalinghi a partire già dagli anni '30 [Formhals A., 1934].

L'*electrospinning* è successivamente emerso come tecnologia di processazione polimerica semplice, efficiente, economica e versatile che permette la produzione di fibre ultrafini. Le fibre elettrospinnate presentano un'elevata area superficiale dovuta al diametro sub-micrometrico delle fibre (frequentemente inferiore a 1  $\mu\text{m}$ ). Di solito, le nanofibre elettrospinnate si organizzano casualmente in una struttura *mesh-like* caratterizzata da

un'elevata interconnettività e porosità, con pori di dimensione nel *range* dei micrometri (**Fig. 3C**) [Martins A. et al., 2008].

Convenzionalmente la tecnica dell'*electrospinning* consiste nell'estrusione di una goccia di una soluzione polimerica, che subisce un flusso estensionale tramite l'applicazione di un campo elettrico esterno e si deposita in un collettore. In particolare, una siringa forza il passaggio della soluzione polimerica attraverso un ago, un generatore, collegato all'ago, carica elettricamente il fluido. All'aumentare dell'intensità del campo elettrico, la superficie del fluido sulla punta del capillare si allunga formando il cosiddetto "cono di Taylor", quando le forze diventano sufficientemente forti da superare la tensione superficiale del fluido, un getto piccolissimo è iniettato nella direzione del collettore. Prima di raggiungere il collettore, il solvente evapora parzialmente portando alla deposizione di fibre lunghe e sottili, a volte nanometriche (**Fig. 4**).



**Figura 4.** Rappresentazione schematica del processo di *electrospinning*

Nel processo di *electrospinning*, il solvente svolge dei ruoli cruciali, infatti solvata le molecole di polimero pronte a formare il getto caricato elettricamente, “accompagna” le stesse molecole al collettore e attraverso una rapida evaporazione, permette l’essiccamento e la formazione delle fibre polimeriche. Pertanto, l’appropriata scelta di un solvente o di una miscela di solventi è un prerequisito fondamentale per ottenere *scaffold* elettrospinnati. Le dimensioni delle fibre ottenute sono comprese tra i nanometri e i micrometri e possono essere regolate agendo sui parametri caratteristici della soluzione, quali la viscosità, la conduttività e la tensione superficiale, oltre che sulle condizioni operative come la pressione idrostatica nell’ago

della siringa, la forza del campo elettrico applicato e la distanza tra la punta dell'ago e il collettore.

La tipica morfologia dello *scaffold* ottenuto tramite questa tecnica corrisponde ad una maglia non intrecciata, porosa, formata da fibre casualmente allineate come in molti tessuti del corpo umano. Inoltre, le maglie di nanofibre elettrospinnate provvedono ad un ambiente appropriato per l'adesione, la proliferazione cellulare e il differenziamento anche quando si usano cellule progenitrici o staminali [Martins A. et al., 2007].

Queste proprietà rendono gli *scaffold* elettrospinnati versatili per diverse applicazioni di ingegneria biomedica per la rigenerazione ossea e cartilaginea [Martins A. et al., 2011; Alves da Silva M.L. et al., 2010 e 2009; Araujo J.V. et al., 2008], e anche come *drug delivery system* [Pitarresi G. et al., 2012; Puppi D. et al., 2011; Martins A. et al., 2010].

Un'altra tecnica che negli ultimi anni sta trovando sempre più terreno fertile nella processazione di biomateriali, è la microfluidica. Questo termine è riferito alla scienza che tratta il comportamento, il preciso controllo e la manipolazione di fluidi e particelle in canali di dimensioni comprese tra alcune decine e alcune centinaia di micrometri [Whitesides G.M., 2006]. La microfluidica è considerata una piattaforma per applicazioni biomediche e chimiche, definita *Lab on a Chip* (LOC) [Sackmann E.K. et al., 2014].

I vantaggi della microfluidica includono:

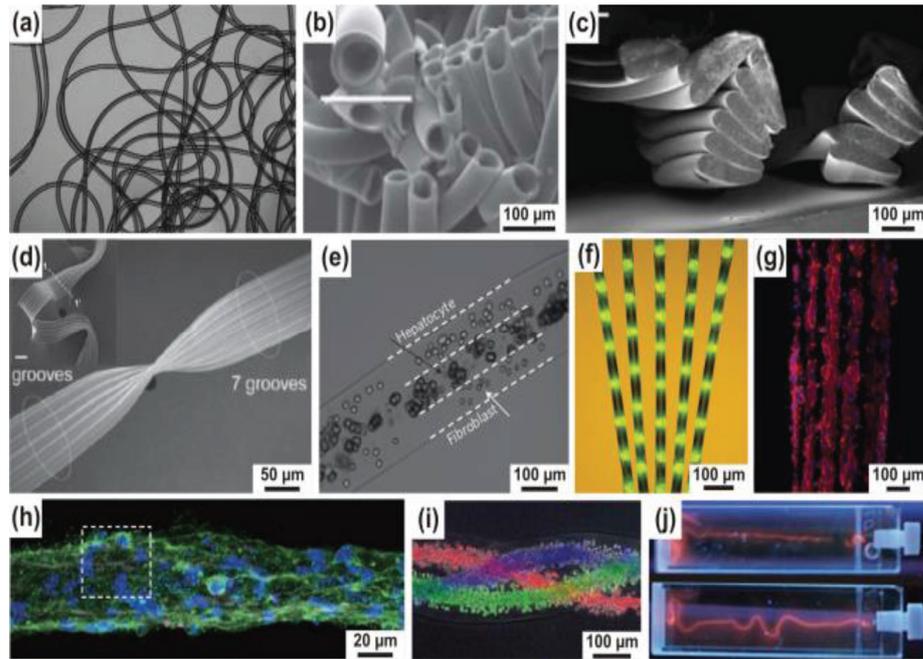
- ridotto uso di volumi di reagenti e campioni,

- rapida processazione del campione,
- elevata sensibilità e basso costo,
- possibilità di essere automatizzata in modo da ridurre l'intervento e l'errore umano.

La microfluidica può essere usata per generare fibre con sezione, lunghezza e composizione chimica ben definita.

Questa tecnica infatti, utilizza un flusso continuo di una soluzione polimerica che subisce sia una trasformazione fisica che chimica o dentro il microcanale o dopo la fuoriuscita dal chip, producendo fibre stabili. La microfluidica non richiede elevati voltaggi o temperature elevate di fusione.

Le fibre inoltre possono essere prodotte su diverse scale di lunghezza con un'ampia varietà di forme usando un enorme ventaglio di polimeri, composizioni di materiali diversi e chip di diversa geometria. Il vantaggio di ottenere microfibre monodisperse, con sezione, forma e composizione del materiale personalizzate offre numerose possibilità per emergenti applicazioni biomediche. La **figura 5** illustra una serie di strutture fibrose che sono state ottenute attraverso questa tecnica con accorgimenti diversi per crearle cave o piene.



**Figura 5.** Le diverse strategie di produzione hanno permesso di ottenere microfibre di diversa morfologia e composizione tramite la tecnica della microfluidica. a) Prime microfibre prodotte in maniera continua da un *device* di microfluidica a flusso concentrico [Jeong W. et al., 2004]; b) microtubi cavi ottenuti tramite un *T-junction chip* [Choi C.H. et al., 2011]; c) Micro-nastri prodotte tramite un *device 3D hydrodynamic focusing* [Thangawng A.L. et al., 2011]; d, g) micronastri con scanalature per favorire l'adesione e l'allineamento cellulare [Kang E. et al., 2012]; e) strati paralleli di epatociti e fibroblasti organizzati all'interno di microfibre [Kang E. et al., 2011]; f) microfibre biomimetiche *bamboo-like* contenenti sferoidi di acido poli(lattico-co-glicolico) (PLGA) [Yu Y. et al., 2014]; h, i) microfibre contenenti cellule staminali mesenchimali differenziate e cellule NIH/3T3 intrecciate insieme [Onoe H. et al., 2013]; j) insieme macroscopico di nanofili di polisaccaridi durante il processo di fabbricazione [Numata M. et al., 2012]

La microfluidica permette di produrre fibre paragonabili perfino all'architettura complicata dei microvasi. In confronto con le tecnologie *standard* di produzione delle fibre, la microfluidica offre quindi diversi vantaggi quali velocità, riproducibilità, resa, purezza, conservazione della funzionalità dei componenti biologici e la possibilità di incapsulare cellule in condizioni biocompatibili [Daniele M.A. et al., 2015].

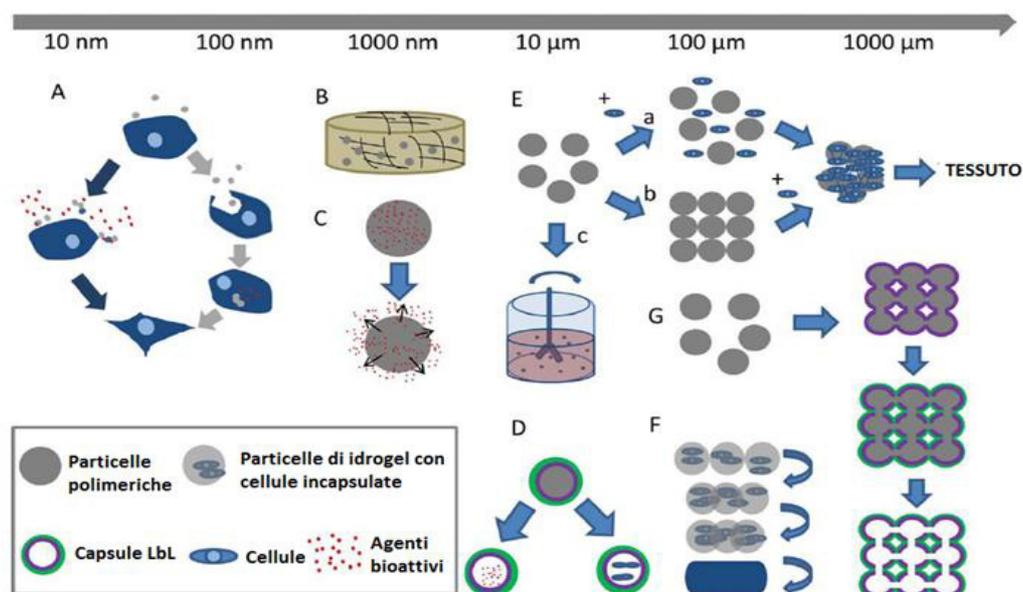
### **1.3.3 Caratteristiche e principali tecniche di produzione di microparticelle per applicazioni in TERM**

Più recentemente è stata suggerita la possibilità di utilizzare sistemi iniettabili o modellabili in cui le cellule possono aderire e proliferare su un substrato solido, come ad esempio sistemi particellari. Tali sistemi possono essere inoculati direttamente in situ, inoltre è possibile veicolare, nella zona interessata, assieme alle cellule precedentemente seminate anche agenti bioattivi utili nel processo di riparazione e di rigenerazione tissutale.

Particelle di diverse tipologie e dimensioni sono da tempo utilizzate per modulare il comportamento cellulare tramite la veicolazione di farmaci o geni, con particolare attenzione al trattamento del cancro e dei disturbi del sistema immunitario.

Nelle strategie di ingegneria tissutale e medicina rigenerativa le nanoparticelle possono essere sfruttate per veicolare sostanze bioattive verso l'interno della cellula sia mediante processi di diffusione, sia direttamente mediante processi di internalizzazione. Anche le microparticelle possono essere impiegate per veicolare sostanze bioattive nell'ambiente circostante le cellule. Il rilascio di proteine (inclusi i fattori di crescita), o di agenti di differenziamento a basso peso molecolare, può indirizzare e controllare il destino delle cellule [Oliveira J. et al., 2008; Weissleder R. et al., 2005; Brzoska M. et al., 2004].

In **figura 6** è possibile osservare schematicamente i molteplici utilizzi delle particelle in TERM. Infatti, a seconda delle dimensioni e delle caratteristiche chimico-fisiche, esse possono essere utilizzate per il rilascio di farmaci o per processi di internalizzazione cellulare (dimensioni nanometriche) (**Fig. 6A**), oppure come microparticelle per ottenere l'aggregazione cellulare, per la formazione di *scaffold* porosi, oppure ancora come *microcarrier* per i processi di espansione cellulare (**Fig. 6E (a),(b),(c)**).



**Figura 6.** Rappresentazione schematica dei diversi utilizzi delle particelle in ingegneria tissutale in relazione alla dimensione. **A)** Nanoparticelle utilizzate per il rilascio di agenti bioattivi nel terreno di coltura cellulare o per l'internalizzazione cellulare. **B)** Incorporazione di microparticelle in sistemi 3D per migliorare le proprietà della matrice. **C)** Utilizzo di microparticelle per il rilascio di agenti bioattivi per il controllo del comportamento cellulare. **D)** Capsule vuote ottenute dalla tecnica *Layer-by-Layer* (LbL), le quali possono contenere agenti bioattivi incapsulati per il rilascio controllato. **E)** Microparticelle nel range di 100-1000 μm possono essere utilizzati: **(a)** in combinazione con cellule per ottenere l'aggregazione cellulo-indotta; **(b)** per permettere la formazione di *scaffold* con porosità interconnessa dopo agglomerazione delle particelle grazie a metodi di sinterizzazione o solubilizzazione; **(c)** come *microcarrier* per l'espansione cellulare. **F)** Impiego di particelle con cellule incapsulate per stampe di organo e *mesoscale self-assembly*. **G)** Produzione di costrutti porosi 3D ottenuti con la strategia LbL

Le microparticelle, quindi, hanno ricevuto un interesse crescente per le loro potenziali applicazioni terapeutiche in diverse applicazioni cliniche e in medicina rigenerativa.

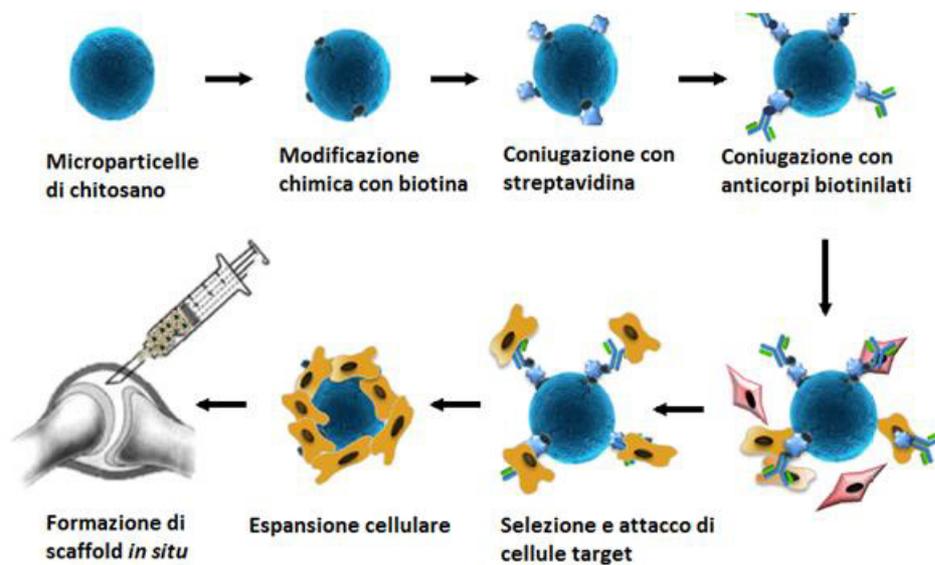
A differenza dell'approccio tradizionale di formazione degli *scaffold*, in cui le cellule sono seminate su un supporto polimerico generalmente biodegradabile, i metodi di produzione tissutale *bottom-up*, usano piccole unità micrometriche per assemblare matrici 3D e costituiscono strumenti potenzialmente utili per ricostruire *scaffold* organomimetici.

Recenti studi hanno dimostrato la possibilità di controllare l'aggregazione di microparticelle e cellule [Tan H.P. et al., 2010].

In contrasto con i comuni sistemi iniettabili che prevedono la polimerizzazione in situ, richiedendo quindi l'uso di monomeri e di iniziatori potenzialmente tossici, questi sistemi costituiscono una promettente alternativa poiché possono essere iniettati in situ e gelificare senza l'utilizzo di nessun agente addizionale di *crosslinking*. Le microparticelle iniettabili sono state utilizzate in vivo per la rigenerazione della cartilagine [Liu X.H. et al., 2011; Mercier N.R. et al., 2005] e del tessuto adiposo [Chung H.J. e Park T.G., 2009].

Quindi l'uso delle microparticelle come *scaffold* iniettabili o come *carrier* per il rilascio di farmaci è un'opzione molto attrattiva specialmente per applicazioni cliniche poiché si riduce la necessità di operazioni chirurgiche invasive.

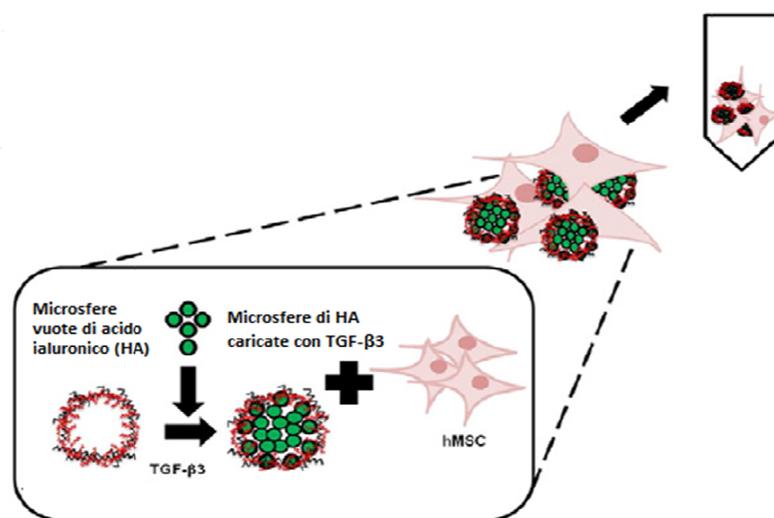
C.A. Custòdio et al. ad esempio, hanno sviluppato sistemi iniettabili in vivo per ingegneria tissutale che permettono di riparare tessuti danneggiati di forme e dimensioni differenti, attraverso procedure chirurgiche poco invasive. In particolare sono state progettate e caratterizzate microparticelle di chitosano che possono essere considerate sistemi iniettabili, capaci di catturare ed espandere una specifica linea cellulare (**Fig. 7**) [Custodio C.A. et al., 2015].



**Figura 7.** Rappresentazione schematica della metodica di preparazione e funzionalizzazione delle particelle di chitosano cellula-selettive

Le cellule staminali mesenchimali umane (*human Mesenchymal Stem Cell*, hMSC) sono state identificate come un'importante fonte cellulare per la rigenerazione cartilaginea. Tuttavia, per indurre il differenziamento condrogenico, le hMCS richiedono l'utilizzo di fattori di crescita, in particolare proteine appartenenti alla famiglia dei fattori di crescita beta

trasformanti (TGF- $\beta$ ). A questo scopo, ad esempio, microsfere condromimetiche di acido ialuronico sono state adoperate come *carrier* e fonte di rilascio di fattori di crescita per la condrogenesi delle hMSC (**Fig. 8**) [Ansboro S. et al., 2014].

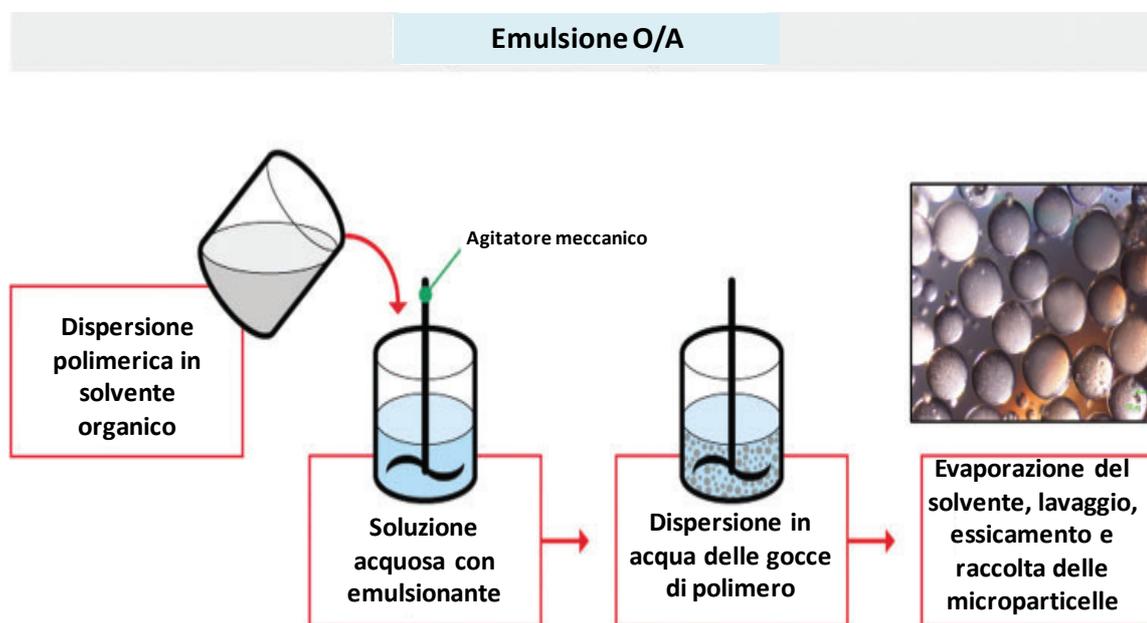


**Figura 8.** Schematizzazione delle microsfere di acido ialuronico caricate con TGF- $\beta$ 3 e coltivate con hMSC

La scelta di un appropriato metodo per la produzione di microparticelle polimeriche, dipende principalmente dalle caratteristiche di solubilità del polimero, dalla dimensione, forma e porosità desiderate delle particelle, nonché dall'applicazione per cui le microparticelle saranno impiegate [Whittlesey K.L. e Shea L.D., 2004; Watts P.J. et al., 1990].

Il metodo più antico per la formazione delle microparticelle consiste nella tecnica dell'emulsione ed evaporazione/estrazione del solvente. Come

descritto da Ogawa Y. e collaboratori, le microparticelle sono prodotte attraverso la formazione di un'emulsione olio/acqua (O/A) e la successiva evaporazione del solvente organico contenente il polimero con conseguente coacervazione dello stesso e formazione quindi delle particelle (**Fig. 9**) [Ogawa Y. et al., 1988].



**Figura 9.** Rappresentazione schematica della produzione di microparticelle tramite formazione di un'emulsione (O/A)

Allo scopo di produrre microparticelle con molecole bioattive incorporate per applicazioni in TERM, è stata introdotta la tecnica della doppia emulsione [Freiberg S. e Zhu X.X., 2004; van de Weert M. et al., 2000]. Ad esempio una doppia emulsione acqua/olio/acqua (A/O/A) è ottenuta dissolvendo un campione (molecola bioattiva) in una soluzione acquosa che a sua volta viene dispersa in una fase organica contenente il polimero con la

formazione di un'emulsione primaria A/O. Successivamente l'emulsione primaria ottenuta, viene dispersa sotto costante agitazione in un eccesso di volume di fase acquosa contenente un agente stabilizzante, ottenendo così una doppia emulsione A/O/A. Le microparticelle sono formate per evaporazione/estrazione del solvente organico dalle gocce che formano l'emulsione [Chau D.Y.S. et al., 2008].

La tecnica della separazione di fase, conosciuta anche come coacervazione, consiste invece nel diminuire la solubilità del polimero stesso tramite l'aggiunta di un "agente di contrasto" (variazione di pH, cambio di temperatura, aggiunta di un elettrolita, aggiunta di un solvente in cui lo stesso polimero risulta poco affine, ecc.) con conseguente formazione di due distinte fasi: una fase contenente il polimero coacervato e una fase contenente il surnatante. Spesso tale tecnica è utilizzata per incapsulare molecole bioattive che vengono rivestite dal polimero coacervato. Il processo di incapsulazione può essere riassunto in quattro distinti *step*:

- separazione delle due fasi, una contenente il polimero e una il surnatante;
- adsorbimento superficiale della fase coacervata sulle molecole da incapsulare;
- solidificazione delle microparticelle ottenute (da 0.5 a 500  $\mu\text{m}$ );
- raccolta, filtrazione, lavaggio ed essiccamento

[Chickering D. et al., 1996; Nihant C. et al., 1995; Edelman R. et al., 1993].

Questa tecnica ha il vantaggio di essere semplice, veloce e permette un'elevata resa, tuttavia presenta diversi limiti quali la concentrazione del polimero usato, l'uso di solventi organici potenzialmente tossici (esempio acetonitrile, dietilere, toluene), variabilità da lotto a lotto, frequente agglomerazione delle particelle dovuta all'assenza di agenti stabilizzanti, ecc. [Thomasin C. et al., 1997; Wu X.S., 1995a e 1995b].

Una nuova e relativamente semplice tecnica per la produzione di microparticelle, prevede l'uso dei fluidi supercritici, come l'anidride carbonica (scCO<sub>2</sub>) e permette sia la formazione delle microparticelle che l'estrazione del solvente in un unico *step* come dimostrato da Muller e Fisher [Muller B.W. e Fischer W., 1991].

In breve, la soluzione organica contenente il polimero è spruzzata in controcorrente nella scCO<sub>2</sub> che permette la precipitazione del polimero e l'incorporazione del farmaco quando desiderato [Hao J. et al., 2004].

La tecnica dello *spray drying*, discussa per primo da Masters K., è un altro metodo semplice, rapido e conveniente per produrre microparticelle [Masters K., 1985]. La tecnologia è facilmente modulabile e riproducibile ed implica l'iniezione diretta di una soluzione polimerica attraverso un ugello riscaldato, seguita dalla rapida evaporazione del solvente attraverso un vapore caldo di un gas che scorre all'interno del sistema [Quaglia F. et al., 2003]. I parametri del processo quali la velocità di spruzzo, la velocità di

caricamento della soluzione farmaco/polimero, la concentrazione polimerica e la temperatura di essiccamento, modulano le dimensioni delle microparticelle formate, dando vita a microparticelle con dimensioni generalmente comprese tra 1 e 130  $\mu\text{m}$  [Blanco M.D. et al., 2005; Wagenaar B.W. e Muller B.W., 1994].

Uno degli strumenti di ultima generazione che permette la produzione di microparticelle con un indice di polidispersità ristretto e di dimensione comprese tra 1 e 10  $\mu\text{m}$ , è il Nano Spray Dryer (BÜCHI) che permette la formazione di microgocce sfruttando una tecnologia innovativa ovvero, tramite la vibrazione di un cristallo piezoelettrico (**Fig. 10**).



**Figura10.** Nano Spray Dryer BÜCHI

Un'altra tecnica innovativa discussa precedentemente è la tecnica della microfluidica, infatti in relazione alle caratteristiche intrinseche della dispersione polimerica, alla metodica utilizzata e alla geometria del chip, è anche possibile ottenere microparticelle con un range dimensionale ristretto e che possono essere impiegate in TERM [Kim S. et al., 2016].

#### **1.4 Modifiche superficiali dei sistemi 3D utilizzati in TERM**

Oltre agli *scaffold*, un altro fattore chiave per controllare le funzioni cellulari e per la rigenerazione tissutale è il *signaling biologico*.

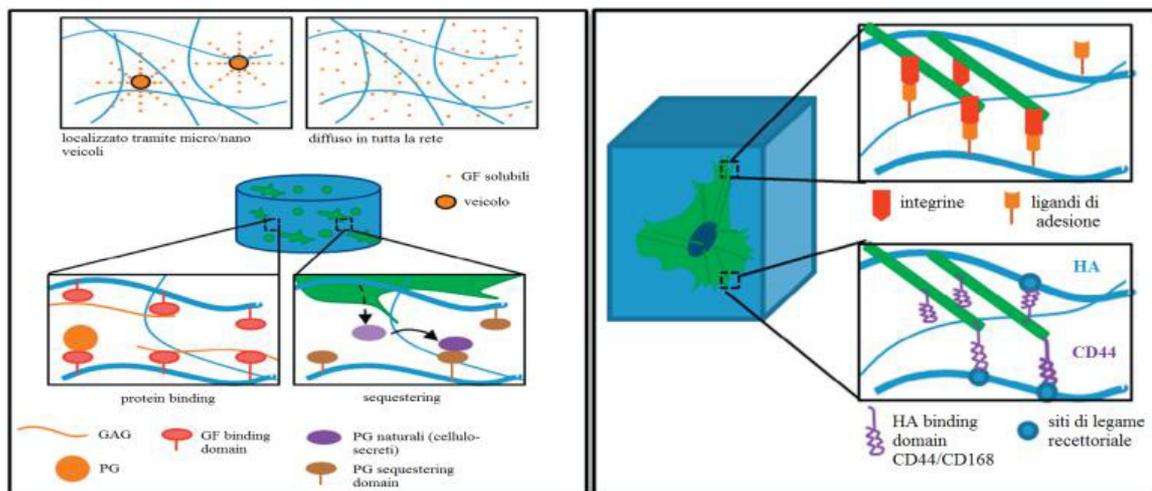
La maggior parte delle interazioni tra le cellule e il materiale impiantato avviene sulla superficie del biomateriale stesso, così, particolare attenzione è rivolta alle caratteristiche che potrebbero favorire tali interazioni.

L'adesione cellulare è mediata dalle integrine, una famiglia di recettori cellulari transmembrana eterodimerici che si legano selettivamente a differenti proteine dell'ECM [Miyamoto S. et al., 1998; Hynes R.O., 1992] e sono capaci di influenzare e regolare la crescita, la sopravvivenza, la migrazione e il differenziamento cellulare [Martin K.H. et al., 2002; Schwartz M.A. e Ginsberg M.H., 2002].

Un classico approccio quindi, per aumentare la biocompatibilità di questi sistemi, è quello di rivestire la loro superficie con molecole adesive come ad esempio le proteine dell'ECM (fibronectina, eparina, collagene, gelatina) [Chung H.J. et al., 2006; Muller J. et al., 2006], o con piccoli frammenti

peptidici (RGD, DGEA, YIGSR, dove R corrisponde all'aminoacido arginina, G glicina, D acido aspartico, E acido glutammico, A alanina, Y tirosina, I isoleucina e S serina) [Lei Y. et al., 2011; Hersel U. et al., 2003] o ancora con particolari polimeri (esempio chitosano, poli(L-lisina)-graftata-poli(etilene glicole) (PLL-g-PEG)), [Simonoska C.M. et al., 2007] per stabilire un contatto stretto tra le cellule e la superficie del biomateriale.

Uno *scaffold* ideale ingegnerizzato dunque, dovrebbe, oltre che mimare meccanicamente l'ECM, interagire positivamente con le cellule, per favorire l'adesione, la crescita, la migrazione e il differenziamento cellulare (**Fig. 11**).



**Figura 11.** Rappresentazione schematica delle possibili modificazioni dello *scaffold* per favorire l'adesione, il differenziamento e la crescita cellulare

In generale, per ottenere la desiderata interazione cellulare con uno *scaffold* polimerico possono essere impiegate, sia modificazioni in *bulk* che di

superficie. La modifica in *bulk* è tipicamente realizzata tramite la copolimerizzazione o il legame di un gruppo funzionale alla catena polimerica prima della fabbricazione dello *scaffold*. Per esempio, il gruppo di Langer R. ha sintetizzato il polimero poli(L-acido lattico-co-L-lisina) e ha legato chimicamente il peptide RGD al residuo di lisina del copolimero per aumentare l'adesione cellulare [Cook A.D. et al., 1997; Barrera D. et al., 1993]. La modificazione chimica in *bulk* cambia la processabilità e le proprietà meccaniche dei polimeri e questo spesso costituisce uno svantaggio.

La modificazione superficiale invece è condotta dopo la formazione dello *scaffold* stesso, di conseguenza, di solito non influenza la struttura e le proprietà meccaniche dello *scaffold* in maniera significativa.

Vi sono diverse strategie per la modificazione superficiale, tra queste, la deposizione superficiale, nota anche come “adsorbimento proteico”, che consiste nel rivestire la superficie del materiale con molecole biologicamente attive. Le molecole sono legate al materiale tramite forze deboli (forze di Van der Waals, legami a idrogeno). La deposizione superficiale si realizza lasciando la superficie del materiale a contatto con una soluzione contenente le biomolecole per un tempo stabilito e in condizioni determinate. Il processo di adsorbimento tuttavia, non è controllabile e quindi rimane incerta la quantità di biomolecole legate per unità di superficie [Di Bello C. e Bagno A., 2009]. Occorre inoltre

considerare che, nel caso di proteine o sequenze peptidiche lunghe, la deposizione superficiale può creare ingombro sterico nel sito attivo, ostacolando l'adesione cellulare e quindi la potenziale rigenerazione del tessuto [Rao S.S. e Winter J.O., 2009].

Il gruppo di Peter X. Ma ha recentemente sviluppato alcune tecniche per modificare le superfici dei pori delle spugne tridimensionali. Per esempio, uno *scaffold* pre-formato di acido poli-L-lattico (PLLA) è stato trattato con una soluzione di gelatina, successivamente lo *scaffold* è stato immerso in un non-solvente (in questo caso acqua). Le molecole di gelatina sono state così immobilizzate sulla superficie dei pori dello *scaffold* stesso [Liu X. et al., 2005].

Sempre dal gruppo di Peter X. Ma è stato proposto un metodo per la modificazione superficiale porogeno-indotta, usando la gelatina sia come agente porogeno che come molecola per modificare la superficie. Come primo *step*, sono state fabbricate sfere di gelatina, che successivamente, sono state miscelate in un  *mold*, con una soluzione polimerica di PLLA. Dopo la separazione di fase e la successiva rimozione del porogeno, è stato ottenuto uno scaffold nano-fibroso di PLLA con un *network* interconnesso di pori sferici modificati con uno strato di molecole di gelatina, la quale aumenta notevolmente lo *spreading* delle cellule, la proliferazione e la secrezione di ECM [Liu X. et al., 2006].

La tecnica dell'*electrostatic attachment* è molto simile all'adsorbimento proteico, ciò che la contraddistingue è il legame elettrostatico tra molecole attive e materiale. Il *layer-by-layer (LbL) assembly* ad esempio, consiste nella deposizione alternata di strati di materiali policationici e polianionici che possono auto-assemblarsi grazie a forze elettrostatiche per produrre rivestimenti con dimensioni nanometriche ( $\sim 100 \text{ \AA}$ ). Per esempio, materiali carichi positivamente possono essere accoppiati elettrostaticamente con molecole di adesione cariche negativamente per produrre strutture alternate di materiale e molecole.

Un processo di *self-assembly layer by layer* elettrostatico è stato utilizzato per modificare anche *scaffold* 3D nano-fibrosi [Liu X. et al., 2005]. Come primo *step* è stato fabbricato uno *scaffold* polimerico nano-fibroso. Successivamente, lo *scaffold* è stato attivato in una soluzione acquosa di poli(di)allildimetilammonio cloruro) (PDAC) per ottenere una superficie con pori carichi positivamente. Lo *scaffold* è stato successivamente immerso alternativamente in una soluzione di macromolecole cariche negativamente (gelatina) e poi nelle soluzioni di macromolecole cariche positivamente (PDAC). Questa tecnica non permette solamente la modifica superficiale ma consente anche di controllare il tipo di carica superficiale e lo spessore dello strato di modificazione della superficie [Liu X. et al., 2005].

Un altro metodo di modificazione chimica di superficie che è stato impiegato per applicazioni in ingegneria tissutale, è la tecnica del *plasma*

*polymerization*, che può essere suddivisa in tre tipologie: *etching*, *grafting* e *deposition plasma* [Barry J.J. et al., 2005].

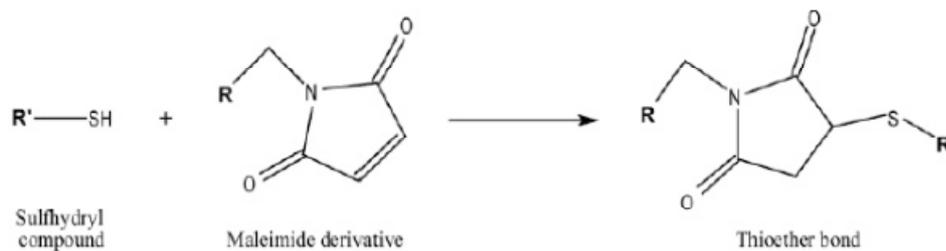
Queste tecniche hanno dimostrato che il trattamento al plasma può influenzare l'adsorbimento delle proteine e il comportamento cellulare sullo *scaffold* polimerico e possono, potenzialmente, essere impiegate per la modificazione di microparticelle per ingegneria tissutale [Wan Y. et al., 2003].

Nel caso di *scaffold* costituiti da nanofibre porose ad esempio, l'efficienza dell'adsorbimento può essere migliorata per mezzo di un trattamento al plasma. Ciò aumenta l'idrofilia delle nanofibre consentendo una maggiore infiltrazione delle soluzioni acquose contenenti biomolecole [Beachley V. e Wen X., 2010]. Il gruppo di Hollinger J.O. ha proposto una modificazione superficiale, usando il metodo del plasma, utilizzando l'ammoniaca, per legare la poli(L-lisina) e il peptide RGD [Hu Y.H. et al., 2003].

Un'altra tecnica, ampiamente utilizzata, di funzionalizzazione superficiale prevede di legare covalentemente le molecole di interesse alla superficie dello *scaffold*. Esistono diverse tecniche di *covalent attachment* specifiche per la funzionalizzazione dei biomateriali. In alcuni casi si utilizzano gruppi reattivi esistenti, in altri casi sono previsti dei pre-trattamenti superficiali per introdurre dei nuovi. Il legame fra biomolecola e materiale può essere infatti diretto oppure può coinvolgere un'ulteriore molecola [Di Bello C. e Bagno A. 2009]. Generalmente si preferisce l'utilizzo di *linker* intermedi piuttosto

che legare direttamente le molecole al biomateriale, in questo modo si riduce l'ingombro sterico in superficie e si preserva la conformazione della proteina o del peptide. La scelta dell'agente di *cross-linking* dipende anche dall'applicazione; per applicazioni *in vivo* per esempio si sceglie un agente in grado di minimizzare la risposta immunitaria. I principali metodi di *covalent attachment* sfruttano i seguenti gruppi reattivi: -SH, -NH<sub>2</sub>, -COOH, -OH.

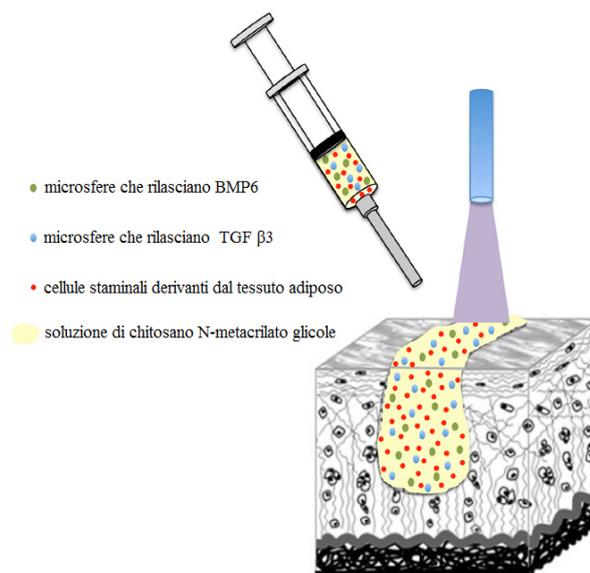
La modificazione chimica per mezzo del gruppo tiolico (-SH) prevede in genere la reazione di un composto sulfidrilico con un maleimide-derivato portando alla formazione di un legame tioetere (**Schema 1**).



**Schema 1** Schema di reazione tra una molecola con il gruppo tiolico e una molecola con il gruppo maleimmidico

A causa della bassa emivita di queste molecole biologiche, il successo dell'impiego dei fattori biologici in ingegneria tissutale dipende anche dalle tecnologie di *delivery*. Il rilascio controllato di tali fattori usando microsfeere ha mostrato ottimi risultati in termini di mantenimento della loro attività biologica [Wei G. et al., 2004].

Sukarto A. et al. hanno incapsulato ASCs (cellule staminali derivate dal tessuto adiposo) in un *hydrogel* a base di N-metacrilato glicol chitosano (MGC) fotopolimerizzabile contenente anche microsfere caricate con BMP-6 e TGF- $\beta$ 3 (**Fig. 12**).



**Figura 12.** Sviluppo di un gel costituito da un polimero fotopolimerizzabile per il rilascio in situ di ASCs insieme a microsfere caricate con BMP-6 e TGF- $\beta$ 3, utilizzato per la riparazione cartilaginea. Dopo l'iniezione del prepolimero nel sito lesionato, questo è foto-reticolato per formare il gel, incapsulando così le ASC e le microsfere all'interno del sito lesionato [Sukarto A. et al., 2012]

I risultati ottenuti hanno evidenziato che la vitalità e il numero di cellule incrementano proporzionalmente con il numero di legami crociati. Inoltre, incorporando un peptide contenente RGD negli *hydrogel* di MGC, la vitalità delle ASCs incrementa con valori superiori al 90% anche dopo 14 giorni in coltura. Confrontando l'effetto di BMP-6 e TGF- $\beta$ 3 rilasciati dalle microsfere con quello ottenuto aggiungendo direttamente i fattori di crescita nel terreno di coltura, è stato osservato che il differenziamento condrogenico

è più rapido nei sistemi contenenti i microveicoli. Infatti, il rilascio locale e sostenuto di BMP6 e TGF- $\beta$ 3 da parte delle microsfele ha incrementato l'espressione di marker condrogenici come i glicosamminoglicani e il collagene II, nonché il rapporto tra collagene II e collagene I, effetti che incrementano con il tempo [Sukarto A. et al., 2012].

### **1.5 Materiali polimerici di natura polisaccaridica per applicazioni in TERM**

Sia polimeri sintetici che naturali hanno un ruolo cruciale nel *design* di sistemi terapeutici e diagnostici per applicazioni mediche così come per la rigenerazione e la sostituzione tissutale. I polimeri sintetici sono candidati per tali applicazioni grazie alle loro proprietà chimiche e fisiche che possono essere facilmente controllate e manipolate, tuttavia mancano della desiderata bioattività e biocompatibilità e potrebbero causare tossicità ed infiammazione [Yao J. et al., 2011]. Molti sforzi sono stati fatti negli anni per migliorare la loro bioattività e biocompatibilità, combinandoli ad esempio con polimeri naturali, proteine e peptidi sintetici [Oh S.H. e Lee J.H., 2013].

I polimeri naturali invece, richiedono in genere un processo di isolamento abbastanza semplice, ed inoltre, subiscono degradazione enzimatica e/o idrolitica nell'ambiente biologico in prodotti non tossici e possono essere modificati da un punto di vista chimico per modularli in base alle necessità

tecnologie, tuttavia la maggior parte presenta scarse proprietà meccaniche [Mkedder I. et al., 2013].

Pertanto, per aumentare e favorire le risposte cellulari intorno al sito di impianto, molti *scaffold* sono stati fabbricati con polimeri di natura biologica come ad esempio chitina, chitosano, cellulosa, alginato, gellan gum e spugna marina e con componenti chiave dell'ECM come il collagene, glicosaminoglicani, fibronectina e laminina [Nandi S.K. et al., 2015; Anitha A. et al., 2014].

È stato osservato che molte delle molecole che compongono l'ECM mostrano capacità di formare complessi e strutture supramolecolari 3D in vivo e ciò ne facilita l'uso come matrici per ingegneria tissutale [Vasir J.K. et al., 2003].

I polisaccaridi sono spesso isolati e purificati da piante, animali e microorganismi. La lista di polisaccaridi usati comunemente per una vasta varietà di applicazioni biomediche include: cellulosa, chitina/chitosano, amido, alginato, acido ialuronico, pullulano, guar gum, xanthan gum, gellan gum e vari glicosaminoglicani (GAG). Questi biopolimeri multifunzionali presentano un ampio *range* di pesi molecolari e differenti caratteristiche chimico-fisiche [Alvarez-Lorenzo C. et al., 2013; Liu Z. et al., 2008].

La maggior parte di questi polimeri sono stati trovati nella matrice extracellulare e partecipano al *signaling* inter e intra cellulare contribuendo anche alla crescita delle stesse cellule. Tutte queste caratteristiche, offrono ai

biomateriali costituiti da polisaccaridi, diversi vantaggi come il riconoscimento biologico, la biocompatibilità e la bioattività. Molti polisaccaridi sono coinvolti nella regolazione dello scambio di ioni e segnali intracellulari che sono cruciali per la crescita degli organismi. Per esempio, l'acido ialuronico (HA) presente nell'ECM, non solo provvede alla lubrificazione delle giunzioni superficiali articolari ma anche controlla la riparazione e la rigenerazione della cartilagine attraverso il mantenimento della proliferazione, migrazione e differenziamento dei condrociti. [Sherman L. et al., 1994]. I proteoglicani (macromolecole composte da un core proteico a cui sono legate covalentemente catene di glicosamminoglicani, GAG) sono coinvolti in varie funzione fisiologiche e patologiche che includono la morfogenesi cellulare, la citochinesi e la plasticità neuronale [Uyama T. et al., 2007].

Nonostante i molteplici vantaggi come biomateriali, i polisaccaridi soffrono di inconvenienti, tra cui variazioni delle proprietà del materiale in base alla fonte, contaminazione microbica, captazione incontrollata di acqua, scarsa resistenza meccanica e processi di degradazione spesso non controllabili. Molti di questi polisaccaridi tuttavia vengono modificati chimicamente al fine di ottenere appropriate proprietà chimico-fisiche che includono stabilità meccanica, degradazione controllata, bioattività e sono processati come microparticelle, *hydrogel*, fibre e strutture 3D porose per diverse

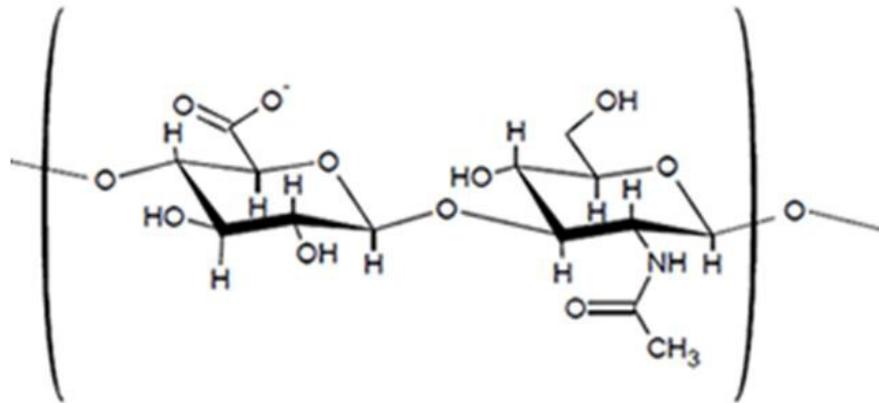
applicazioni in ingegneria tissutale [Palumbo F.S. et al., 2015a; Palumbo F.S. et al., 2015b] e nel *drug delivery* [Palumbo et al., 2015c].

Infatti, la struttura dei polisaccaridi presenta gruppi funzionali (soprattutto ossidrilici, carbossilici e amminici) che rendono possibile la loro modificazione chimica [Baldwin A.D. e Kiick K.L., 2010]. Per esempio, il *grafting* di monomeri sintetici sulla catena polisaccaridica permette di controllare la solubilità del polimero nei solventi desiderati, l'*uptake* di acqua e la degradazione. Questi polimeri semisintetici offrono caratteristiche ottimali e in genere migliori rispetto ai polimeri naturali e sintetici. Varie tecniche di *cross-linking* inoltre, sono state sviluppate per limitare il movimento delle catene polisaccaridiche, per controllarne la cattura di acqua, la degradazione e le proprietà meccaniche [Alvarez-Lorenzo C. et al., 2013; Matricardi P. et al., 2013].

### **1.5.1 Acido ialuronico**

L'acido ialuronico (HA) è l'unico glicosamminoglicano non solforato della matrice extracellulare dove svolge un fondamentale ruolo biologico e strutturale, essendo per esempio, coinvolto nel processo di riparazione delle ferite, nella rigenerazione cartilaginea e nell'omeostasi oculare [Maharjan A.S. et al., 2011; Burdick J.A. e Prestwich G.D., 2011]. In particolare, l'HA è un polisaccaride lineare composto da unità ripetitive di acido D-glucuronico e N-acetil-glucosamina (**Fig. 13**) e ha un peso molecolare

compreso nel range  $10^3$ - $10^7$  Dalton [Gerecht S. et al., 2007; Toole B.P., 2001].



**Figura 13.** Struttura dell'unità ripetitiva dell'acido ialuronico

Il peso molecolare dell'HA influenza la sua attività, infatti quello ad elevato peso molecolare è coinvolto principalmente nel mantenimento del tono tissutale grazie alla sua attività osmotica, mentre l'HA a basso peso molecolare è coinvolto nell'attività di *signaling* e riconoscimento cellulare [D'Agostino A. et al., 2015]. Il ruolo biologico dell'HA è sfruttato in ambito farmaceutico, nel riconoscimento di specifici recettori di *binding* implicati nella proliferazione cellulare, nella morfogenesi e nell'infiammazione. Per esempio diversi organi e cellule tumorali sovra-esprimono recettori di *binding* per l'HA quale il “*cluster determinant 44*” (CD 44) [Grass G.D. et al., 2013; Wang S.J. e Bourguignon L.Y.W., 2011] che è coinvolto nella

proliferazione di diversi tumori; il recettore per la “*hyaluronate-mediated motility*” (RHAMM) e il recettore per l’endocitosi dell’HA (HARE) sono coinvolti a livello epatico nel regolare l’*uptake* cellulare, invece il recettore dell’endotelio dei vasi linfatici (LYVE-1) gioca un ruolo importante nella regolazione autocrina della crescita cellulare [Schledzewski K. et al., 2006].

L’HA trova una vasta applicazione in campo farmaceutico come viscosizzante per il trattamento dell’osteoartrite, o per la chirurgia oftalmica ed è impiegato per produrre biomateriali per applicazione biomedica e per l’ingegneria tissutale [Prestwich G.D., 2011; Balazs E.A., 2009].

L’HA è stato anche funzionalizzato introducendo catene adatte ad ottenere degli *hydrogel in situ-forming* [Schanté C.E. et al., 2011; Elisseeff J., 2004].

Già dalla fine degli anni '90, l’HA è stato utilizzato per la produzione di profarmaci macromolecolari e come direzionante sfruttando le sue capacità di *binding* selettivo verso specifici recettori [Misra S. et al., 2010]. Il rationale per la produzione di derivati chimici dell’HA può essere riassunto nei seguenti punti: a) migliorare le proprietà chimico-fisiche, cambiando l’affinità e la solubilità in acqua, regolando il comportamento viscoelastico e la resistenza idrolitica e producendo quindi dei derivati dell’HA più adatti per l’impiego in campo biomedico; b) sfruttare le proprietà di *targeting* dell’HA ottenendo dei derivati solubili in acqua o aggregati nanometrici; c) sviluppare profarmaci con proteine terapeutiche dove l’acido ialuronico può agire da *carrier* idrofilo sia per aumentare il tempo di circolazione della

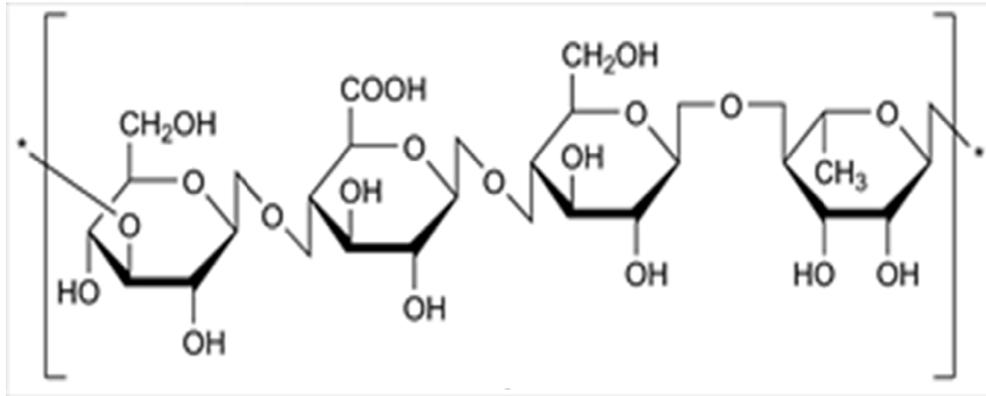
proteina riducendone il riconoscimento da parte del sistema immunitario, sia come *targeting* verso organi e tessuti ricchi di recettori per l'HA migliorando l'effetto terapeutico della proteina stessa.

Per ottenere dei derivati dell'HA, vengono spesso utilizzati polimeri sintetici e polimeri naturali. I polimeri sintetici, come ad esempio i poliesteri, non hanno una specifica attività biologica, infatti sono legati al *backbone* di HA per sfruttare le loro proprietà strutturali; i polimeri naturali invece, sono polimeri bioattivi e sono legati all'HA per ottenere un rilascio direzionato e migliorare il comportamento farmacocinetico.

La presenza di gruppi carbossilici e idrossilici sull'HA permette diverse modificazioni chimiche per modularne le proprietà meccaniche e la degradazione senza perdita della sua bioattività.

### **1.5.2 Gellan gum**

*Il Gellan gum* (GG) è un esopolisaccaride ad elevato peso molecolare secreto dallo *Pseudomonas elodea*. È composto da un'unità ripetitiva tetrasaccaridica formata da un'unità di L-ramnosio (Rhap), una di  $\beta$ -D-acido glucuronico (GlcA) e due di  $\beta$ -D-glucosio (Glc), come proposto da Jansson P. E. et al. [Jansson P.E. et al., 1983] (**Fig.14**).



**Figura 14.** Struttura dell'unità ripetitiva del Gellan Gum

Il GG è un additivo alimentare che viene usato come stabilizzante, addensante e agente gelificante in un'ampia varietà di cibi. Recentemente, il gellan gum è stato studiato come un materiale che può essere usato per scopi d'ingegneria biomedica a causa della sua biocompatibilità e bassa citotossicità [Silva-Correia J. et al., 2011; Oliveira J.T. et al., 2010].

Di solito il GG forma *hydrogel* fisici attraverso variazioni di temperatura o per la presenza di cationi, in particolar modo cationi divalenti. È noto, da dati riportati in letteratura, che il GG esibisce un cambio conformazionale da uno stato di disordine (catena singola) a uno stato ordinato (doppia elica) abbassando la temperatura, e la successiva gelificazione è mediata dalla formazione di doppie eliche e dall'associazione di quest'ultime favorita dalla quantità e dal tipo di cationi metallici [Ogawa E., 1997; Nishinari K. et al., 1996; Milas M. et al., 1990]. Tuttavia, come tutti gli *hydrogel* ionici, il GG tende a perdere stabilità meccanica nel tempo a causa dello scambio tra i cationi divalenti e quelli monovalenti nei fluidi fisiologici [LeRoux M.L. et

al., 1999]. Un altro svantaggio nell'uso del GG in campo biomedico è la necessità di una temperatura elevata (90°C per 20-30 minuti) per solubilizzare il polimero. Per superare questi limiti, sono state proposte delle modifiche chimiche sul backbone di GG. Per esempio Coutinho D.F. e collaboratori hanno suggerito la metacrilazione del gellan gum (MeGG) inserendo con un metodo semplice doppi legami sul *backbone* polimerico in modo tale da poter ottenere *hydrogel* fotoreticolabili e combinare quindi metodi fisici e chimici per ottenere sistemi più compatti e stabili meccanicamente. Inoltre, il derivato ottenuto (MeGG) è solubile a temperature più basse e quindi risulta più facilmente processabile (50°C per 10 minuti) [Coutinho D.F. et al., 2010].

## 2. Scopo della tesi

La matrice extracellulare agisce come un supporto per le cellule in grado di sostenere la loro proliferazione e il loro differenziamento, contribuendo dunque all'organogenesi e alla rigenerazione tissutale per lesioni di piccole dimensioni. Nei casi di traumi e difetti tissutali che interessano un'ampia regione, i processi di rigenerazione naturale non riescono a riparare il danno [Tabata Y., 2009; Smith I.O. et al., 2009; Kimura Y. et al., 2007].

Per questo motivo, come riportato nel capitolo precedente, il *design* e lo sviluppo di un microambiente artificiale per le cellule (*scaffold*) che ne assista l'iniziale adesione e ne promuova la successiva proliferazione e il differenziamento, rappresenta un approccio terapeutico innovativo e promettente per le pratiche di rigenerazione tissutale [Kimura Y. et al., 2007].

È necessario che lo *scaffold*, come già riportato, imiti determinate caratteristiche chimico-fisiche e meccaniche del tessuto da sostituire oltre a rispondere alle caratteristiche fisiologiche tipiche della regione del corpo in cui verrà impiantato.

I biomateriali, a tale scopo, vengono processati in diverse strutture come: spugne porose, microparticelle, fibre, ecc., allo scopo di creare l'opportuna nicchia fisiologica.

La scelta di un biomateriale per applicazioni in TERM è dettata dall'applicazione finale e richiede rigorose considerazioni riguardo le sue proprietà chimiche, chimico-fisiche e meccaniche [Shoichet M.S., 2010; Owen S.C. e Shoichet M.S., 2010; Lee K.-W. et al., 2010]. Le interazioni biologiche tra biomateriale ed ECM circostante giocano anch'esse un ruolo fondamentale nella scelta dei materiali, suggerendo infatti la loro funzionalizzazione con specifiche biomolecole per promuovere l'adesione e la proliferazione cellulare [Sokolsky-Papkov M. et al., 2007].

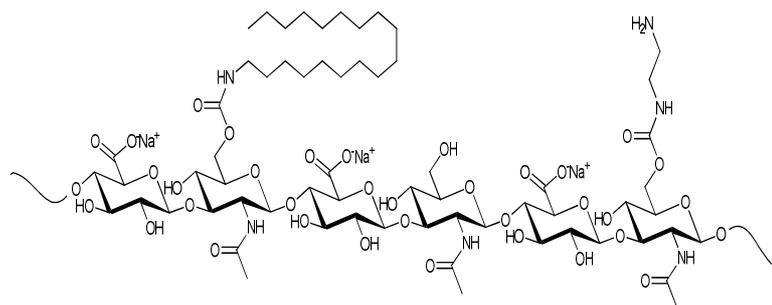
Diversi materiali naturali sono stati studiati e proposti per lo sviluppo di *scaffold* 3D per applicazioni in TERM, questi infatti, presentano una buona biodegradabilità, bassa tossicità e bassi costi di produzione e smaltimento. Inoltre, offrono diversi vantaggi nell'applicazione in ingegneria tissutale, come il *signaling biologico* che favorisce l'adesione cellulare. Tuttavia, il loro uso è generalmente limitato dalla loro elevata solubilità nei fluidi fisiologici, dalla rapida degradazione e dalla potenziale perdita delle caratteristiche biologiche intrinseche durante il processo di formulazione. A causa di questi inconvenienti, molti polimeri naturali vengono opportunamente funzionalizzati prima di essere processati nei vari *device* per l'ingegneria tissutale.

L'acido ialuronico, ad esempio, è uno dei maggiori componenti del fluido sinoviale trovato nella cartilagine articolare ed è in grado di controllare la proliferazione e il mantenimento del fenotipo dei condrociti [Spiller K.L. et

al., 2011; Kim I.L. et al., 2011], tuttavia viene modificato chimicamente al fine di modulare le sue peculiari proprietà chimico-fisiche, per migliorare la resistenza idrolitica e meccanica e favorire la produzione di *scaffold* che possano mimare le caratteristiche strutturali e meccaniche dell'ECM per permettere l'attecchimento e la crescita delle cellule seminate.

Considerato tale stato dell'arte, scopo della presente tesi sperimentale di dottorato, è stato quello di derivatizzare dei polisaccaridi naturali, in particolare sono stati scelti l'acido ialuronico (HA) e il gellan gum (GG), per modificarne le caratteristiche chimiche, chimico-fisiche, meccaniche e biologiche, per renderli facilmente processabili e per costruire microambienti 3D artificiali per potenziali applicazioni in medicina rigenerativa.

In particolare, ad alcuni gruppi ossidrilici dell'N-acetil-glucosammina dell'HA è stata legata l'ottadecilammina ( $C_{18}\text{-NH}_2$ ) tramite una preliminare attivazione degli stessi gruppi ossidrilici con il bis(4-nitrofenil) carbonato (4-NPBC); altri gruppi ossidrilici della porzione N-acetil-glucosamminica dell'HA sono stati invece funzionalizzati con etilendiammina (EDA) sempre tramite una preliminare attivazione con il 4-NPBC ottenendo il copolimero siglato HA-EDA- $C_{18}$  (**Fig. 15**).



**Figura 15.** Struttura dell'unità ripetitiva dell'HA-EDA-C<sub>18</sub>

La funzionalizzazione idrofobica ottenuta tramite l'introduzione della catena alchilica permette la formazione di *device crosslinkati* fisicamente, senza l'uso di *crosslinker* chimici, cioè, non è possibile ottenerlo con l'HA di partenza [Chen J. et al., 2014; Kim T.G. et al., 2008; Ji Y. et al., 2006]. L'introduzione del gruppo amminico primario (gruppo EDA) aumenta invece la versatilità chimica e l'affinità verso il mezzo acquoso.

La maggiore processabilità dell'HA-EDA-C<sub>18</sub> rispetto all'HA, è stata sfruttata per produrre matrici extracellulari artificiali con diverse geometrie per possibili applicazioni in TERM.

Sono state prodotte infatti spugne porose attraverso la tecnica del *salt leaching* sfruttando la capacità dell'HA-EDA-C<sub>18</sub> di *crosslinkare* fisicamente quando forzato attraverso una siringa caricata con NaCl, scelto come porogeno. Sono stati studiati lo *swelling* e la stabilità delle spugne così ottenute, in mezzi a forza ionica fisiologica. Il carattere idrofobico dell'HA-EDA-C<sub>18</sub> è stato sfruttato anche per caricare una molecola bioattiva lipofila, il desametasone (Dex) scelto perchè è un noto stimolatore

condrogenico [Koehler K.C. et al., 2013; Na K. et al., 2006], al fine di dimostrare se la spugna di HA-EDA-C<sub>18</sub> è in grado di consentire un rilascio prolungato nel tempo del farmaco caricato. Inoltre la presenza di gruppi amminici primari è stata sfruttata per legare una porzione maleimmidica, scelta come “connettore” chemio-selettivo per legare peptidi tiolici; le spugne infatti, per aumentarne le proprietà adesive, sono state successivamente funzionalizzate con un motivo RGD ciclico (cy-RGDC) [Jäger M. et al., 2013; Wohlrab M. et al., 2012]. Le proprietà biologiche istruttive degli *scaffold* di HA-EDA-C<sub>18</sub>, funzionalizzati e non con cy-RGDC e caricati e non con Dex, sono state valutate su condrociti bovini primari che sono stati seminati sugli stessi.

Un ulteriore obiettivo della presente tesi è stato quello di sfruttare la versatilità dell'HA-EDA-C<sub>18</sub> e la sua sensibilità alla forza ionica per produrre fibre fisiche stabili tramite la tecnica della microfluidica.

In particolare al fine di valutare come la diversa concentrazione salina influenzi le proprietà delle microfibre prodotte, il chip è stato immerso in soluzioni di tampone fosfato (PBS) a diversa concentrazione e sono state prodotte microfibre fisiche caricate e non con desametasone. La morfologia delle stesse, è stata analizzata tramite microscopio ottico e microscopio elettronico a scansione (SEM), ed è stata studiata la *drug loading* e la cinetica di rilascio dalle microfibre caricate con il farmaco, ottenute nei mezzi a forza ionica differente.

L'HA-EDA-C<sub>18</sub> è stato impiegato anche per produrre particelle aventi una potenziale attività condrogenica con la tecnica dello *spray drying*. Nella prima fase dello studio, sono state messe a punto le condizioni operative da utilizzare, quali la concentrazione del polimero usato e la temperatura interna del sistema. Le microparticelle ottenute con le diverse condizioni impostate sono state caratterizzate da un punto di vista chimico-fisico. Sfruttando la metodologia sintetica utilizzata per le spugne di HA-EDA-C<sub>18</sub>, le microparticelle, per renderle potenzialmente condro-stimolanti, sono state funzionalizzate con TGF- $\beta$ 3 (fattore di crescita avente un effetto condrogenico) e cy-RGDC. È stata studiata la funzionalizzazione superficiale sulle microparticelle e la quantità di cy-RGDC legata. Un lotto di microparticelle è stato caricato con Dex al fine di modulare il rilascio dello stesso farmaco ed è stata valutata la cinetica di rilascio in mezzo fisiologico. Allo scopo di dimostrare qualitativamente il potenziale effetto condro-istruttivo del sistema ideato, le cellule staminali mesenchimali del midollo osseo (*Bone Marrow-human mesenchymal stem cells*, BM-hMSC) sono state coltivate con le microparticelle caricate con Dex insieme a quelle funzionalizzate con cy-RGDC e TGF- $\beta$ 3 e a giorni stabiliti sono state effettuate delle analisi istologiche e immuno-istochimiche.

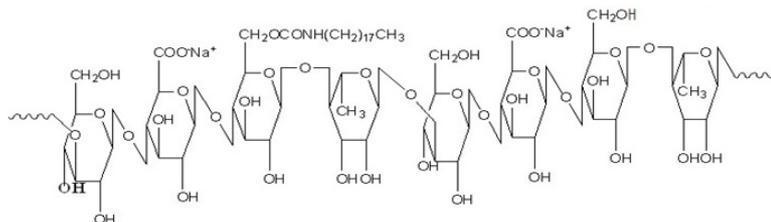
Le stesse microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub> ottenute tramite la tecnica dello *spray drying*, in un successivo lavoro sperimentale, al fine di migliorarne la *performance* meccanica, sfruttando la versatilità chimica, sono state

opportunamente reticolate chimicamente per rafforzare l'interazione microparticella-microparticella.

In particolare un lotto di microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub> è stato funzionalizzato con una funzione maleimmidica, un altro lotto di microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub> è stato invece funzionalizzato con il 2-imminotiolano. In seguito i due gruppi di microparticelle, (quelle con la funzione maleimmidica e quelle con la funzione tiolica), sono state miscelate al fine di dimostrare la possibile reticolazione chimica mediante reazione di *Michael*. Durante la fase di *crosslinking*, le microparticelle sono state funzionalizzate con il peptide fibronectina-simile cy-RGDC (sfruttando la reattività della porzione maleimmidica) per aumentare l'adesione delle cellule al sistema microparticellare e la quantità di cy-RGDC legata è stata calcolata tramite HPLC. Le BM-hMSC sono state coltivate con le microparticelle reticolate chimicamente e non, in mezzo di differenziamento condrogenico e sono state studiate le proprietà meccaniche tramite analisi reologica. Allo scopo di dimostrare la compatibilità biologica tra il processo di reticolazione e le cellule staminali coltivate, è stata valutata la vitalità delle stesse tramite analisi *LIVE&DEAD*.

Un ulteriore scopo del presente lavoro di tesi di dottorato è stata la derivatizzazione chimica del gellan gum (GG) al fine di modularne alcune proprietà chimico-fisiche.

In particolare è stato studiato l'effetto di una catena idrofobica, direttamente *graftata* al backbone idrofilo del GG ad elevato peso molecolare, sulle proprietà chimico-fisiche e meccaniche del polisaccaride. Per la sintesi del copolimero, è stata utilizzata la stessa procedura impiegata per funzionalizzare l'HA, ovvero tramite una preliminare attivazione dei gruppi ossidrilici primari del  $\beta$ -D-glucosio in presenza del 4-NPBC con successivo legame dell'ottadecilammina ottenendo il derivato siglato come GG-C<sub>18</sub> (Fig.16)



**Figura 16.** Struttura dell'unità ripetitiva del GG-C<sub>18</sub>

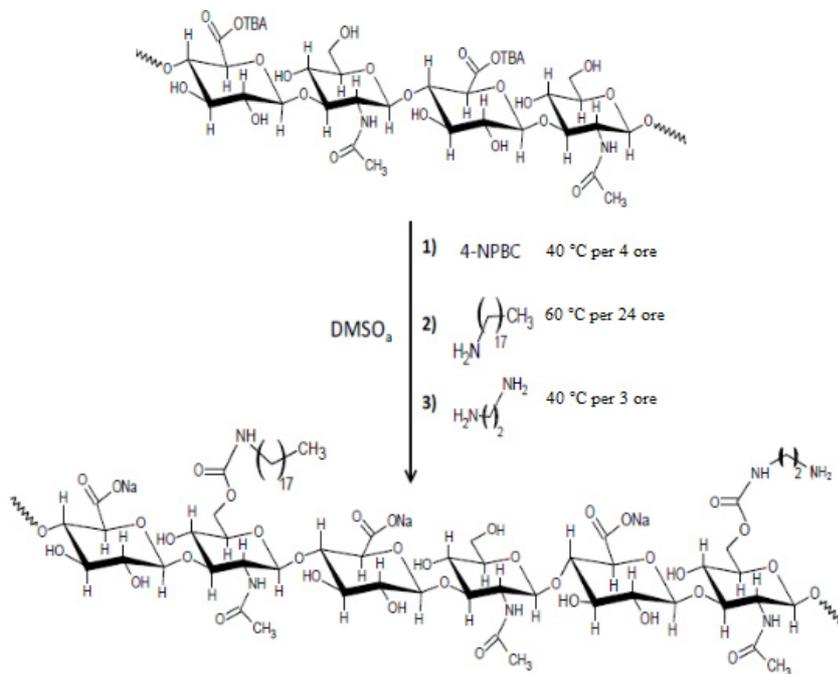
Sono stati ottenuti, utilizzando quantità differenti di 4-NPBC e ottadecilammina, due diversi derivati, siglati come GG-C<sub>18</sub> (1) e GG-C<sub>18</sub> (2). L'avvenuta funzionalizzazione chimica è stata confermata tramite analisi ATR-FTIR e DSC. Inoltre sono state studiate le caratteristiche termo-reologiche di entrambi i derivati paragonandoli con il GG di partenza. Infine, sono stati ottenuti *hydrogel* fisici (grazie alla presenza di ioni) del derivato GG-C<sub>18</sub> (2) e sono state studiate le loro proprietà meccaniche, il

grado di *swelling* e la stabilità fisica in mezzi fisiologici, allo scopo di valutare il potenziale impiego in ambito biomedico di tali nuovi materiali.

### 3. Risultati e discussioni

#### 3.1 Sintesi e caratterizzazione del polimero HA-EDA-C<sub>18</sub>

La sintesi del nuovo derivato dell'HA, siglato HA-EDA-C<sub>18</sub>, è stata eseguita attraverso tre *step* consecutivi senza isolamento degli intermedi di reazione (Schema 2).



**Schema 2.** Schema di sintesi del polimero HA-EDA-C<sub>18</sub>

La prima fase della reazione ha previsto l'attivazione dei gruppi ossidrilici primari della porzione N-acetil-glucosamminica dell'HA tramite il bis(4-nitrofenil) carbonato (4-NPBC), effettuata in dimetilsolfossido anidro, la reazione di attivazione è stata condotta per 4 ore a 40°C; l'attivazione con il 4-NPBC è quantitativa [Palumbo FS et al., 2012]. I due *step* successivi (2 e 3) hanno previsto l'aggiunta dei nucleofili ottadecilammina (24 ore a

60°C) ed etilendiammina (3 ore a 40°C) con conseguimento del *grafting* sulle catene di HA-TBA. Il polimero ottenuto è stato purificato dal TBA e dai composti non reagiti mediante una procedura descritta in dettaglio nel paragrafo 5.3.

Il grado di funzionalizzazione del derivato ottenuto è stato pari a  $12 \pm 1.3$  mol % per le catene di C<sub>18</sub> e  $30 \pm 0.5$  mol % per le porzioni EDA, determinato tramite analisi <sup>1</sup>H-NMR e analisi colorimetrica.

Il derivato ottenuto è capace di formare dispersioni colloidali in acqua poiché il carattere idrofobico, dovuto all'introduzione di catene alchiliche a 18 atomi di carbonio, è bilanciato sia dal *backbone* idrofilo dell'HA che dai gruppi amminici idrofilici introdotti. Tuttavia, l'affinità in acqua decresce aumentando la forza ionica del mezzo, ciò favorisce la coacervazione del polimero a causa della desolvatazione delle catene idrofobiche. Questa sensibilità alla forza ionica è stata sfruttata per ottenere biomateriali *cross-linkati* fisicamente resistenti alla dissoluzione ed all'idrolisi in mezzi fisiologici [Palumbo F.S. et al., 2016; Agnello S. et al., 2016; Palumbo F.S. et al., 2015b].

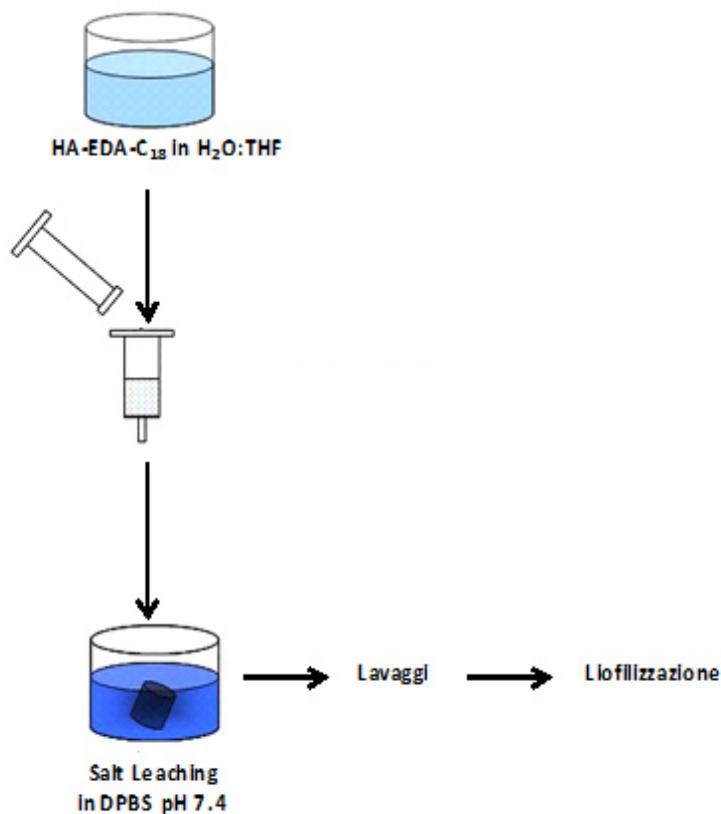
## **3.2 Spugne porose di HA-EDA-C<sub>18</sub>**

### **3.2.1 Produzione di spugne porose di HA-EDA-C<sub>18</sub>**

Le spugne porose di HA-EDA-C<sub>18</sub> sono state prodotte come rappresentato nello **schema 3**. Inizialmente è stata preparata una dispersione colloidale

dell'HA-EDA-C<sub>18</sub> ad una concentrazione dell'8% p/v in H<sub>2</sub>O/THF 2:1 v/v; è stato scelto un solvente volatile miscibile con l'acqua (THF) per aumentare la concentrazione polimerica nella dispersione colloidale mantenendo una fluidità accettabile.

La dispersione polimerica è stata poi forzata attraverso il cloruro di sodio, scelto come porogeno, caricato nella siringa (vedi paragrafo 5.4.1)



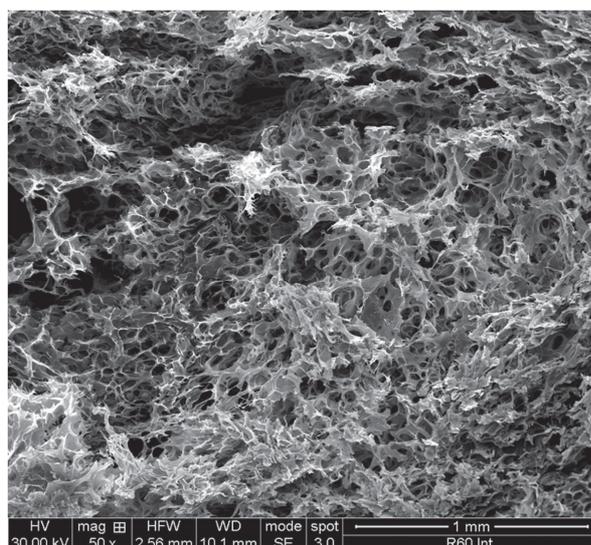
**Schema 3.** Rappresentazione schematica della procedura seguita per la produzione delle spugne porose

La presenza del sale ha causato la desolvatazione del derivato HA-EDA-C<sub>18</sub> che così ha coacervato, permettendo la formazione di *hydrogel cross-linkati* fisicamente. Dopo 24 ore, i campioni cilindrici formati da polimero e sale

sono stati tagliati come descritto nella parte sperimentale (paragrafo 5.4.1) e sono stati immersi in DPBS pH 7.4 per far avvenire il *salt leaching* e dopo numerosi lavaggi, sono stati congelati e liofilizzati.

### 3.2.2. Caratterizzazione delle spugne di HA-EDA-C<sub>18</sub>

La **figura 17** mostra l'immagine SEM della spugna ottenuta dopo liofilizzazione.



**Figura 17.** Immagine SEM della spugna di HA-EDA-C<sub>18</sub>

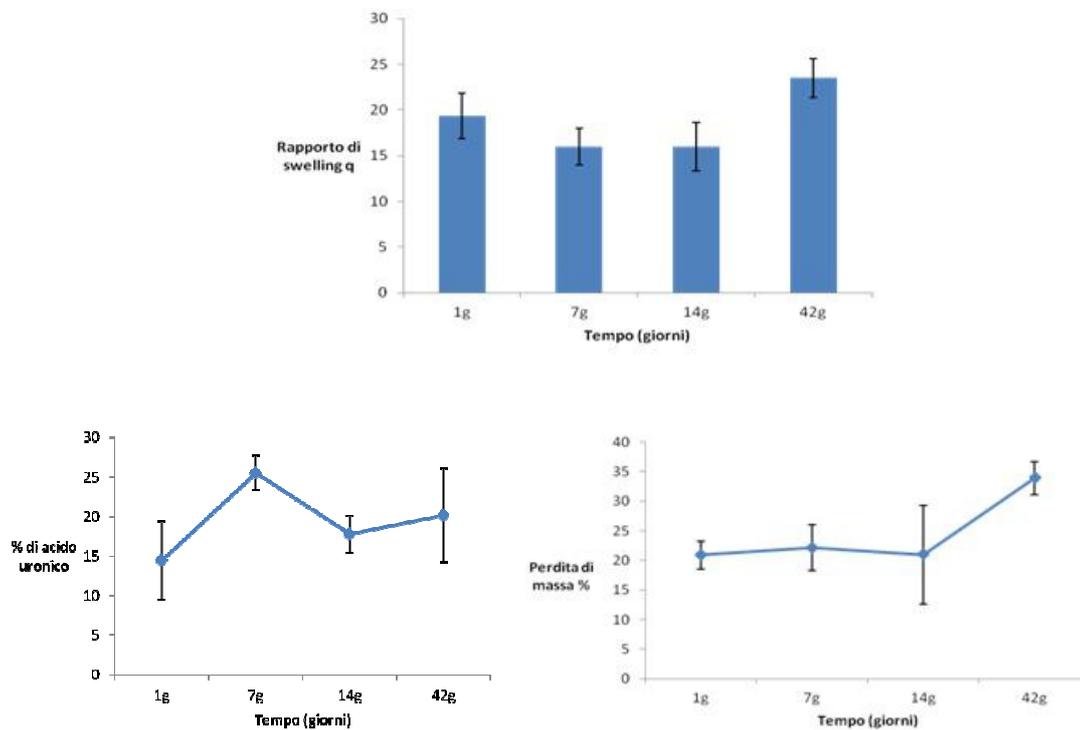
Le spugne di HA-EDA-C<sub>18</sub> mostrano una porosità del  $64 \pm 0.4$  % e una distribuzione dei pori uniforme.

La stabilità delle spugne è stata valutata tramite studi di *swelling*, studi di dissoluzione polimerica e di perdita in massa, in DPBS pH 7.4 e in DPBS

pH 7.4 in presenza di HAasi alla concentrazione di 30 e 60 U/ml (**Fig. 18 e 19**).

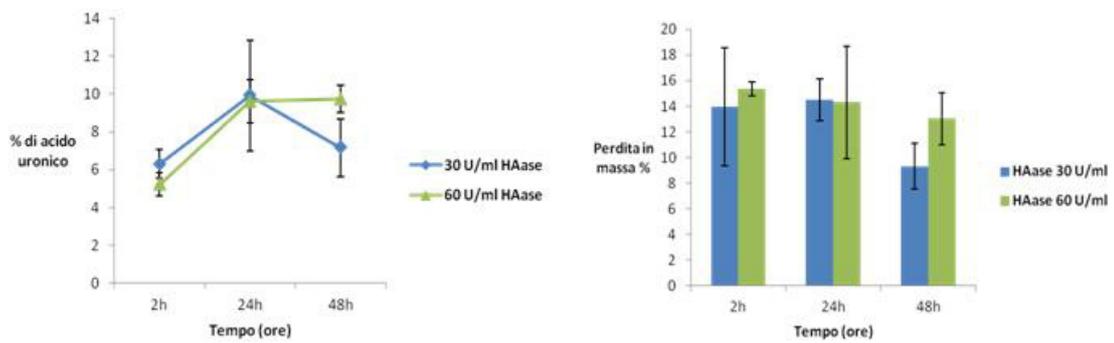
Dopo 24 ore in DPBS pH 7.4, le spugne sono rigonfiate significativamente ( $q=18$ ), questo valore è rimasto praticamente costante fino al 14° giorno. Dal 14° al 42° giorno invece, è stato osservato un sensibile e statisticamente significativo aumento del valore di  $q$  ( $p<0.05$ ) (**Fig. 18**).

Inoltre, dopo 24 ore, è stata osservata una perdita in massa di circa il 20%, questo valore è rimasto tale fino al 14° giorno ed è aumentato fino al 35% dopo 42 giorni ( $p<0.05$ ). La percentuale di acido uronico rilasciata da ciascuna spugna varia tra 15 e 25% senza significative variazioni durante tutto il tempo dello studio.



**Figura 18.** Grafici degli studi di *swelling* e di degradazione chimica in DPBS pH 7.4 delle spugne di HA-EDA-C<sub>18</sub>

Come mostrato in **figura 19**, le spugne di HA-EDA-C<sub>18</sub> si sono mostrate abbastanza stabili anche in presenza di HAasi. Infatti, i valori della perdita in massa percentuale e di acido uronico rilasciato dopo le prime 24 ore in DPBS pH 7.4 sia con 30 che con 60 U/ml di HAasi, sono del tutto sovrapponibili ai corrispettivi valori ottenuti dopo 24 ore nello studio di idrolisi chimica. Inoltre tali valori non subiscono un incremento significativo durante le 48 ore di studio.



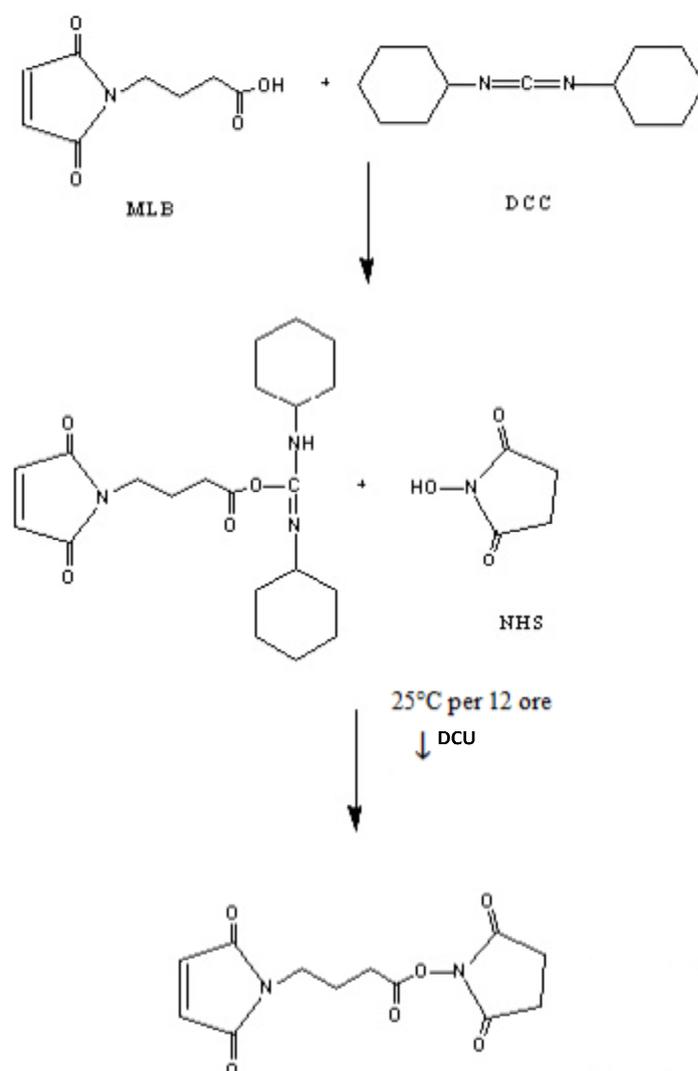
**Figura 19.** Grafici degli studi di degradazione enzimatica delle spugne di HA-EDA-C<sub>18</sub>

Questi studi hanno confermato l'elevata stabilità alla dissoluzione e all'idrolisi delle spugne porose di HA-EDA-C<sub>18</sub> in mezzo fisiologico. Infatti, la percentuale di acido uronico rilasciata dalle spugne di HA-EDA-C<sub>18</sub> è rimasta costante durante ciascun esperimento. L'aumento del rapporto di *swelling* e della percentuale di perdita in massa osservata al 42° giorno non sono stati associati ad un incremento dell'acido uronico rilasciato e questo risultato può essere spiegato se supponiamo che la degradazione dello *scaffold* è dovuta principalmente alla perdita di frammenti micrometrici insolubili, piuttosto che dalla dissoluzione di frazioni di HA solubili in acqua. Altri biomateriali ottenuti con simili derivati dell'HA hanno mostrato un'analogia stabilità all'idrolisi [Palumbo F.S. et al., 2015a].

### 3.2.3 Sintesi del derivato MLB-NHS

L'acido 4-maleimmidobutirrico (MLB) è stato utilizzato come spaziatore chemio-selettivo per il *grafting* dell'RGD ciclico (cy-RGDC). Il legame di

MLB alla porzione amminica primaria dell'HA-EDA-C<sub>18</sub>, è stato effettuato previa attivazione del gruppo carbossilico di MLB con N-idrossisuccinimide (NHS) e N,N'-dicicloesilcarbodiimide (DCC). Il derivato MLB-NHS è stato sintetizzato in una reazione a 2 *step* come mostrato nello **schema 4**.



**Schema 4.** Schema di sintesi del derivato MLB-NHS

Il primo *step* ha previsto l'attivazione del gruppo carbossilico del MLB con DCC, in diclorometano. In seguito, l'intermedio, particolarmente instabile,

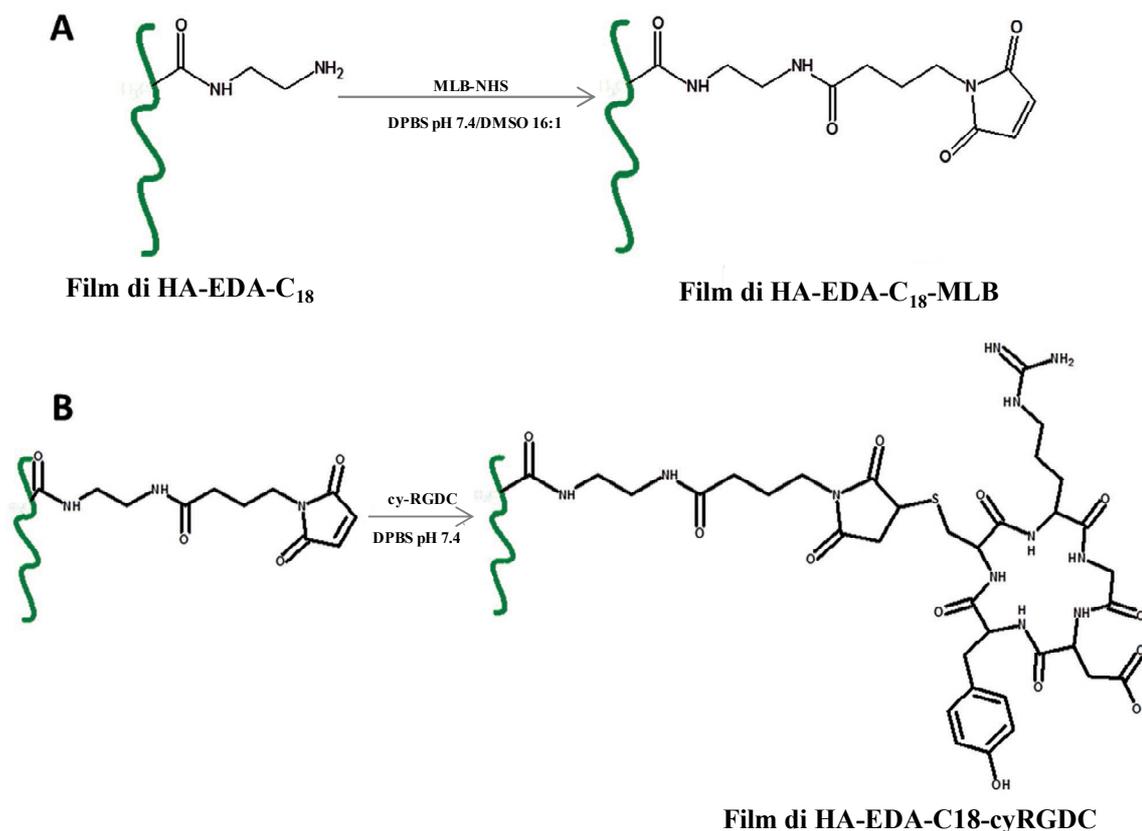
ha subito l'attacco nucleofilo da parte dell'ossidrile del NHS (secondo *step*), con formazione di dicitloesilurea, la cui precipitazione sposta ulteriormente l'equilibrio di reazione verso la formazione dell'estere MLB-NHS. Il prodotto è stato così filtrato, isolato e successivamente cristallizzato.

La reazione è stata monitorata tramite cromatografia su strato sottile (TLC) usando una lastra fluorurata. Tramite lettura alla lampada UV è stata registrata una progressiva scomparsa nel tempo delle macchie di DCC, MLB e NHS e la comparsa di una nuova macchia, attribuibile al derivato MLB-NHS.

#### **3.2.4. Valutazione qualitativa del *grafting* di MLB-NHS e di cy-RGDC su un film bidimensionale di HA-EDA-C<sub>18</sub>**

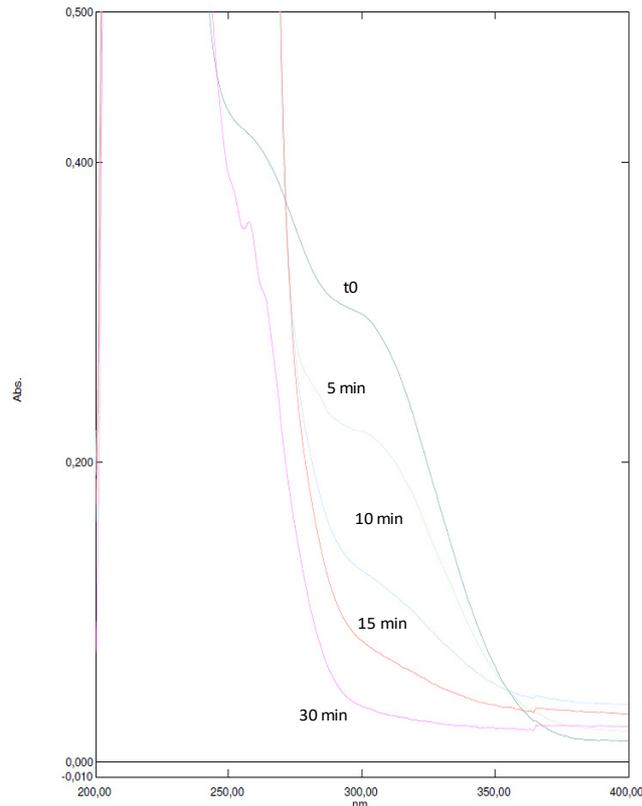
La reattività del derivato MLB-NHS e il potenziale effetto bioadesivo del cy-RGDC legato, sono stati testati preliminarmente su film bidimensionali di HA-EDA-C<sub>18</sub>.

Il derivato MLB-NHS è stato legato al *backbone* polimerico come spaziatore chemio-selettivo per permettere l'addizione tipo *Michael* del cy-RGDC (**Schema 5**).



**Schema 5.** Procedura di legame del cy-RGDC sul backbone dell'HA-EDA-C<sub>18</sub>; **A)** funzionalizzazione con MLB-NHS; **B)** funzionalizzazione con cy-RGDC

Lo spettro UV del film di HA-EDA-C<sub>18</sub>-MLB a differenza dello spettro UV del film di HA-EDA-C<sub>18</sub> mostra una “spalla” a 300 nm che è attribuibile al doppio legame maleimmidico. La cinetica della reazione di funzionalizzazione del film polimerico con il cy-RGDC è stata seguita valutando la scomparsa della “spalla” a 300 nm in funzione del tempo (**Fig. 20**).



**Figura 20.** Spettri UV registrati durante i primi 30 minuti della reazione tra il film di HA-EDA-C<sub>18</sub>-MLB e il cy-RGDC (in DPBS pH 7.4). La “spalla” a 300 nm è attribuibile alla porzione maleimmidica legata all’HA-EDA-C<sub>18</sub>

Il risultato ottenuto, suggerisce che la saturazione di tutti i gruppi maleimmidici è avvenuta dopo appena 30 minuti, si può pertanto affermare che la maleimmide è un buon gruppo chemio-selettivo per legare il gruppo tiolico del cy-RGDC.

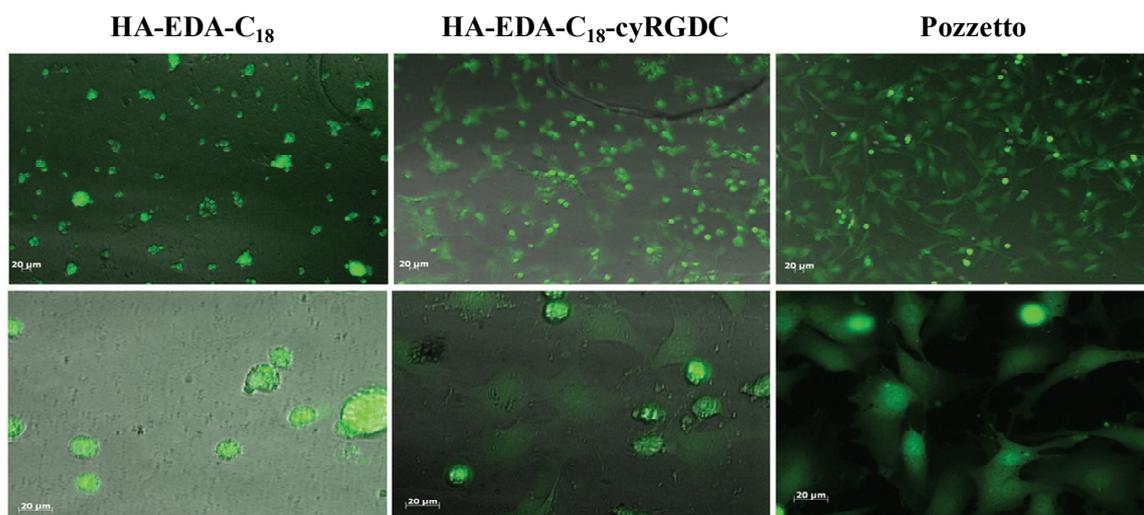
### 3.2.5 Studi di adesione cellulare condotti su film di HA-EDA-C<sub>18</sub>-cyRGDC

Il cy-RGDC è stato legato al derivato dell'acido ialuronico al fine di migliorare l'adesione delle cellule al biomateriale che, infatti, è mediata da integrine, molte delle quali riconoscono la semplice sequenza peptidica

Arg-Gly-Asp (RGD) come ligando. Il legame covalente di questi peptidi di adesione cellulare ai biomateriali è un metodo ampiamente accettato per migliorare l'adesione biologica e l'interazione con le cellule.

Pertanto è stato condotto uno studio di adesività cellulare con i condrociti bovini al fine di valutare se il cy-RGDC legato al film di HA-EDA-C<sub>18</sub> fosse disponibile all'interazione con le cellule.

Dalla **figura 21** si nota una bassa adesione cellulare sui film di HA-EDA-C<sub>18</sub> in accordo con le note proprietà “anti-adesive” dell’HA [Ombelli M. et al., 2011; D’Sa R.A. et al., 2011], inoltre i condrociti hanno formato dei *cluster* cellulari. Invece, sui film di HA-EDA-C<sub>18</sub>-cyRGDC il numero di cellule adese è aumentato con il passare del tempo e dopo 48 ore di coltura, le cellule apparivano con una morfologia allungata e con numerose estroflessioni cellulari similmente a quanto osservato nei pozzetti della piastra di coltura.



**Figura 21.** Immagini ottenute al microscopio a fluorescenza degli studi di adesione cellulare dei condrociti sui film di HA-EDA-C<sub>18</sub>, HA-EDA-C<sub>18</sub>-cyRGDC e sul pozzetto della piastra di coltura dopo 48 ore. Ingrandimenti a 40x e 10x, scale bar 20 µm

Questo studio qualitativo ha confermato la fattibilità della procedura di funzionalizzazione su biomateriali di HA-EDA-C<sub>18</sub> attraverso la chimica della maleimmide e la possibilità di migliorare l'adesione cellulare funzionalizzando i biomateriali con cy-RGDC.

### 3.2.6 *Grafting* del derivato MLB-NHS e del cy-RGDC sulle spugne di HA-EDA-C<sub>18</sub>

La stessa procedura chimica usata per legare il cy-RGDC sui film di HA-EDA-C<sub>18</sub>, è stata impiegata per funzionalizzare le spugne 3D.

La quantità di MLB-NHS legata è stata valutata in funzione del tempo.

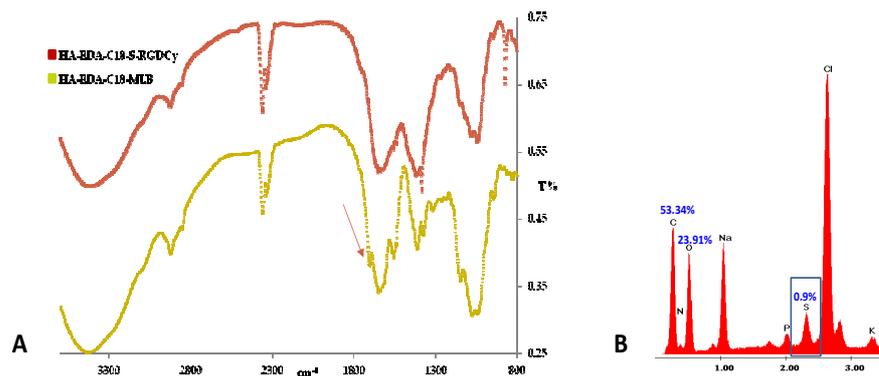
Come mostrato in **tabella 1**, all'aumentare del tempo di reazione (fino a 24-

48 ore) non è stato registrato un incremento statisticamente significativo della quantità di MLB legata.

**Tabella 1.** Quantità di MLB-NHS reagita (mg) per mg di spugna in funzione del tempo di reazione

Tempo (ore)	Massa della spugna (mg)	mg MLB-NHS/mg spugna
7	1.56±0.26	0.104±0.002
24	1.94±0.14	0.125±0.015
48	2.71±0.13	0.101±0.043

La successiva funzionalizzazione delle spugne con cy-RGDC è stata valutata qualitativamente. Le analisi FTIR sono state eseguite sulle spugne di HA-EDA-C<sub>18</sub>-cyRGDC e su quelle di HA-EDA-C<sub>18</sub>-MLB. Nella **figura 22 A**, è evidente la scomparsa del picco a 1707 cm<sup>-1</sup>, attribuibile alla maleimmide, nello spettro delle spugne di HA-EDA-C<sub>18</sub>-cyRGDC. La **figura 22 B** mostra il picco dello zolfo visibile nello spettro EDAX delle spugne funzionalizzate con cy-RGDC. Le analisi FTIR ed EDAX hanno suggerito quindi, l'avvenuta funzionalizzazione dei gruppi maleimmidici delle spugne di HA-EDA-C<sub>18</sub>-MLB con cy-RGDC. Non è stata notata inoltre, una significativa differenza negli spettri EDAX effettuati su più sezioni delle spugne (risultati non mostrati), ciò indica un'omogenea funzionalizzazione della spugna 3D.



**Figura 22.** A) Spettri FTIR delle spugne di HA-EDA-C<sub>18</sub>-cyRGDC (rosso) e di HA-EDA-C<sub>18</sub>-MLB (giallo). B) Analisi EDAX sulle spugne di HA-EDA-C<sub>18</sub>-cyRGDC

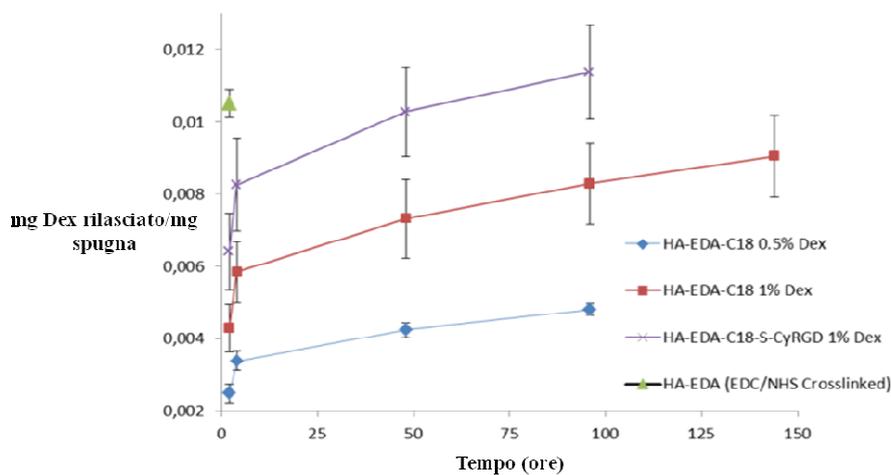
Considerando questi risultati e supponendo che la saturazione dei gruppi maleimmidici sia dovuta principalmente alla reazione con il gruppo tiolico, si può stimare una funzionalizzazione di 0.18 mg di cy-RGDC per mg di spugna di HA-EDA-C<sub>18</sub>.

### 3.2.7 Caricamento del desametasone nelle spugne di HA-EDA-C<sub>18</sub> e HA-EDA-C<sub>18</sub>-cyRGDC e studi di rilascio

Il desametasone è stato scelto come effettore condro-stimolante [Takano T. et al., 1985; Kato Y. e Gospodarowicz D., 1985] e rappresenta inoltre un modello opportuno per testare l'abilità delle spugne di HA-EDA-C<sub>18</sub> nel permettere il caricamento e il rilascio controllato di molecole bioattive idrofobiche. Tramite la procedura dell'impregnazione, descritta nella parte sperimentale (paragrafo 5.4.7), è stata ottenuta un'efficienza di caricamento del 100% ottenendo così delle spugne caricate allo 0.5% p/p e 1% p/p con

Dex. Spugne di HA-EDA reticolate chimicamente e caricate all'1% p/p con Dex sono state usate come paragone.

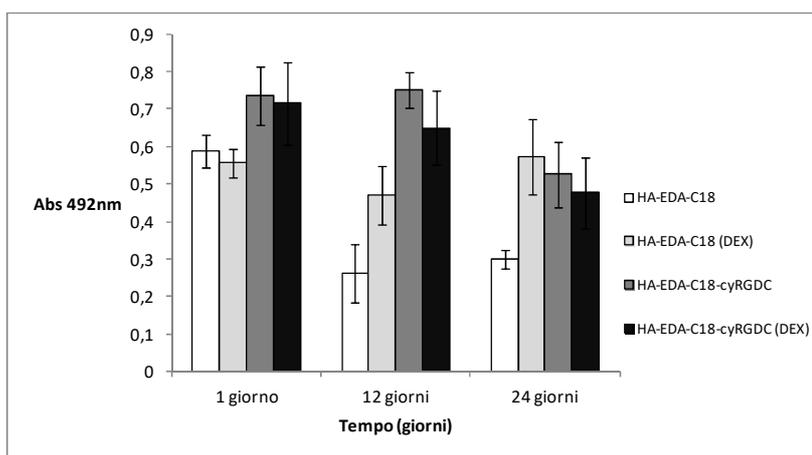
Il Dex è stato completamente rilasciato dopo appena 2 ore dall'incubazione dalle spugne di HA-EDA, invece, è stato osservato un rilascio controllato per le spugne di HA-EDA-C<sub>18</sub> e HA-EDA-C<sub>18</sub>-cyRGDC (**Fig. 23**). Le spugne di HA-EDA-C<sub>18</sub> (0.5% p/p di Dex) e HA-EDA-C<sub>18</sub>-cyRGDC (1% p/p di Dex) hanno rilasciato tutto il farmaco entro 96 ore, invece le spugne di HA-EDA-C<sub>18</sub> caricate all'1% p/p di Dex hanno permesso un rilascio fino a 144 ore. I dati ottenuti suggeriscono che la presenza delle catene di ottadecilammina ha migliorato l'affinità delle spugne verso il desametasone.



**Figura 23.** Profili di rilascio del Dex dalle spugne di HA-EDA, HA-EDA-C<sub>18</sub> e HA-EDA-C<sub>18</sub>-cyRGDC, espressi come mg di farmaco rilasciato per mg di spugna in funzione del tempo

### 3.2.8 Coltivazione in vitro di condrociti bovini su spugne di HA-EDA-C<sub>18</sub> e HA-EDA-C<sub>18</sub>-cyRGDC

Come mostrato in **figura 24**, dopo 1 e 12 giorni di coltura, le spugne di HA-EDA-C<sub>18</sub>-cyRGDC (con e senza Dex) hanno permesso un aumento dell'attività metabolica dei condrociti se paragonate con le spugne di HA-EDA-C<sub>18</sub> con o senza desametasone ( $p < 0.05$ ) in accordo con l'aumentata adesione cellulare mediata dal cy-RGDC.

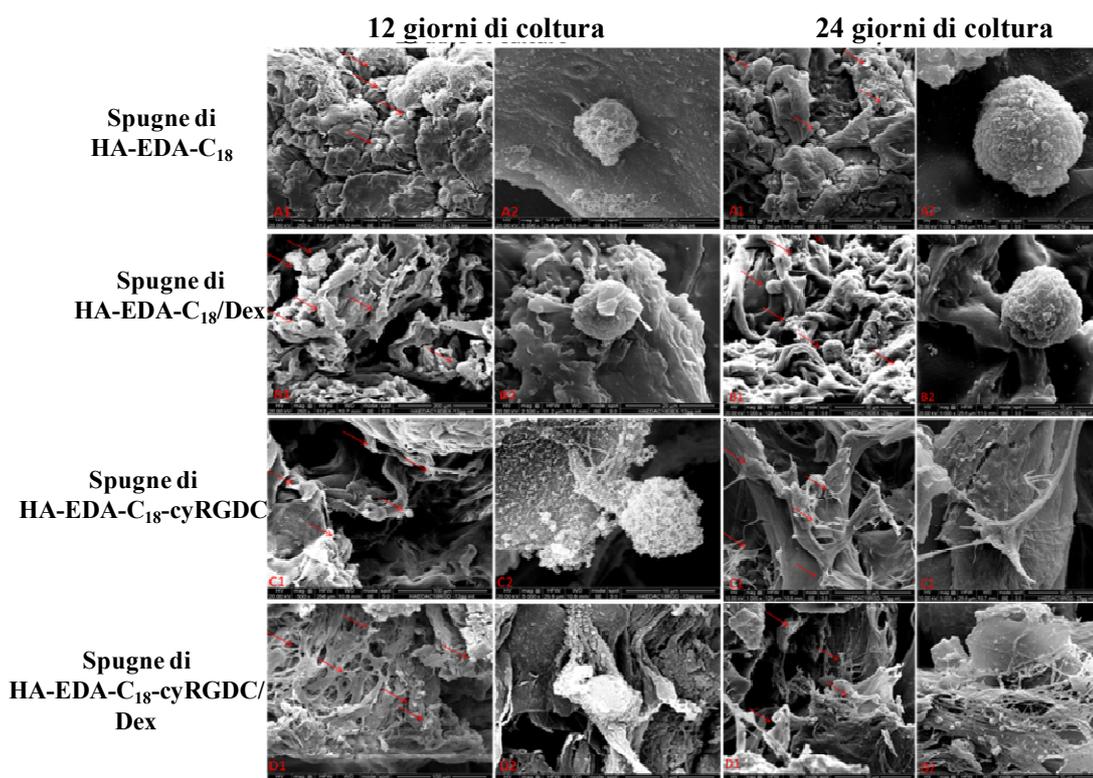


**Figura 24.** Attività metabolica dei condrociti bovini coltivati nelle spugne. Il saggio MTS è stato eseguito sui condrociti seminati sulle spugne di HA-EDA-C<sub>18</sub> con e senza Dex e sulle spugne di HA-EDA-C<sub>18</sub>-cyRGDC con e senza Dex dopo 1, 12 e 24 giorni di coltura ( $p < 0.05$ )

Al 12° giorno, è stata notata una significativa diminuzione dell'attività metabolica cellulare nelle spugne di HA-EDA-C<sub>18</sub> rispetto al primo giorno, inoltre, sul fondo dello stesso pozzetto, sono state trovate delle cellule, indicando così che l'affinità per la spugna è stata persa. Ciò non si nota per le spugne caricate con il Dex che quindi ha agito da stimolatore dell'attività metabolica dei condrociti.

Dopo 24 giorni, non sono state osservate differenze statisticamente significative, tra l'attività metabolica delle cellule sulle spugne funzionalizzate con cy-RGDC (con e senza Dex) e sulle spugne di HA-EDA-C<sub>18</sub> caricate con il Dex. Questo effetto può essere ragionevolmente attribuito alla stimolazione a lungo termine del Dex sull'attività metabolica dei condrociti [Takano T. et al., 1985; Kato Y. e Gospodarowicz D., 1985].

Le immagini SEM dei condrociti adesi nelle spugne di HA-EDA-C<sub>18</sub> con e senza Dex (**Figure A1, A2, B1 e B2**) e nelle spugne di HA-EDA-C<sub>18</sub>-cyRGDC con e senza Dex (**Figure C1, C2, D1 e D2**) dopo 12 e 24 giorni di coltura sono mostrati in **figura 25**.

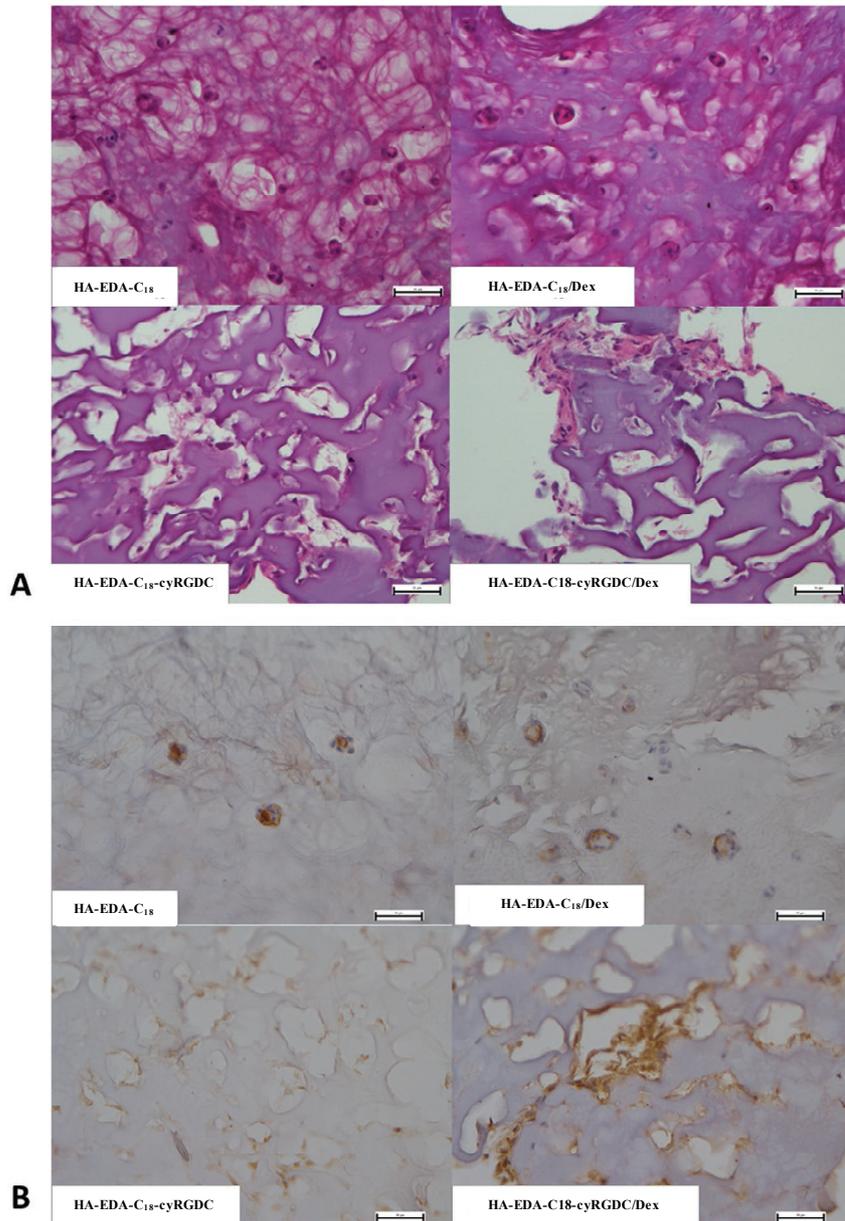


**Figura 25.** Adesione dei condrociti bovini sulle spugne. **A)** Immagini SEM delle spugne di HA-EDA-C<sub>18</sub> (Ingrandimento : A1 500, A2 5000); **B)** spugne di HA-EDA-C<sub>18</sub> caricate con Dex (ingrandimenti: B1 1000; B2 5000); **C)** spugne di HA-EDA-C<sub>18</sub>-cyRGDC (ingrandimenti: C1 1000, C2 5000); e **D)** spugne di HA-EDA-C<sub>18</sub>-cyRGDC caricate con Dex (ingrandimenti: D1 1000, D2 5000) dopo 12 e 24 giorni di coltura. Le frecce rosse indicano i condrociti bovini adesi

Dopo 12 e 24 giorni di coltura, i condrociti coltivati sulle spugne di HA-EDA-C<sub>18</sub>-cyRGDC sono apparsi allungati e con diverse protusioni cellulari a differenza di quelli coltivati sulle spugne di HA-EDA-C<sub>18</sub> che invece presentavano una morfologia più arrotondata e un minor numero di protusioni.

### 3.2.9 Studi di istologia e immunoistochimica sulle spugne di HA-EDA-C<sub>18</sub> e HA-EDA-C<sub>18</sub>-cyRGDC

L'analisi istologica e immunoistochimica è mostrata nella **figura 26**.



**Figura 26.** A) Colorazione con H&E e B) immunoistochimica per il collagene di tipo II sui condrociti bovini dopo 24 giorni di coltura nelle spugne di HA-EDA-C<sub>18</sub> con e senza desametasone e di HA-EDA-C<sub>18</sub>-cyRGDC con e senza desametasone. *Scale bar* 50µm

Nell'immagine della colorazione con H&E, i condrociti nelle spugne di HA-EDA-C<sub>18</sub> (con e senza Dex) hanno formato degli aggregati isolati di forma sferica scarsamente adesi, invece in quelle funzionalizzate con cy-RGDC, le cellule sono adese su tutto il biomateriale e hanno iniziato a mostrare primi segni di rimodellamento. Il risultato è evidente anche nella **figura 26B** che mostra l'analisi immunoistochimica per il collagene di tipo II. Infatti, la deposizione di collagene di tipo II è stata osservata solo nelle matrici funzionalizzate con cy-RGDC. Il colore più intenso inoltre, indicativo della presenza di collagene di tipo II, è stato notato nelle spugne di HA-EDA-C<sub>18</sub>-cyRGDC caricate con Dex, suggerendo un effetto sinergico condrostimolante da parte del cy-RGDC e del Dex.

### **3.3 Microfibre di HA-EDA-C<sub>18</sub>**

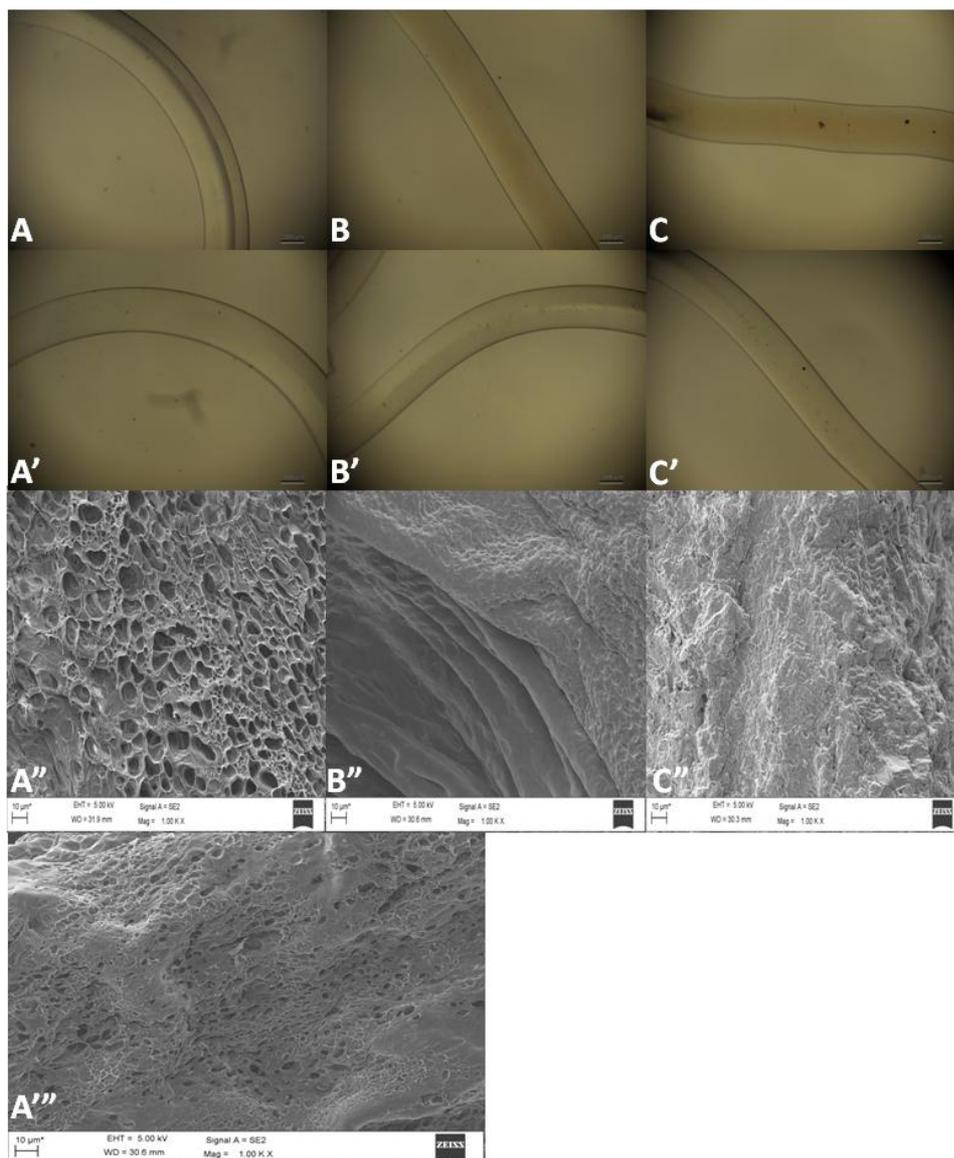
#### **3.3.1 Tecnica di produzione delle microfibre di HA-EDA-C<sub>18</sub>**

L'HA-EDA-C<sub>18</sub> come già evidenziato, è insolubile in soluzioni saline acquose. Partendo da questa proprietà del polimero, è stata progettata una semplice tecnica per la produzione di fibre tramite l'uso della microfluidica. In particolare, è stato impiegato un sistema microfluidico per controllare il *self-assembly* spontaneo dell'HA-EDA-C<sub>18</sub>. Il chip è stato immerso in PBS a differente concentrazione, PBS 1x, 5x e 10x in modo tale che quando la dispersione dell'HA-EDA-C<sub>18</sub> esce dal canale del chip, l'etanolo diffonde nel PBS e il polimero, grazie alla forza ionica del mezzo, coacerva formando

microfibre fisiche stabili senza l'uso di *crosslinker* chimici. Il processo di produzione è semplice e compatibile con molte molecole biologiche, infatti le microfibre sono state formate senza l'uso di procedure chimiche aggressive. Inoltre, questa metodica ha permesso la produzione di microfibre uniformi in maniera riproducibile.

### **3.3.2 Caratterizzazione e studio qualitativo della stabilità delle microfibre di HA-EDA-C<sub>18</sub>**

La morfologia della superficie delle microfibre di HA-EDA-C<sub>18</sub>, ottenute in PBS a diversa concentrazione salina, è stata osservata tramite microscopio ottico e analisi SEM (**Fig. 27**).



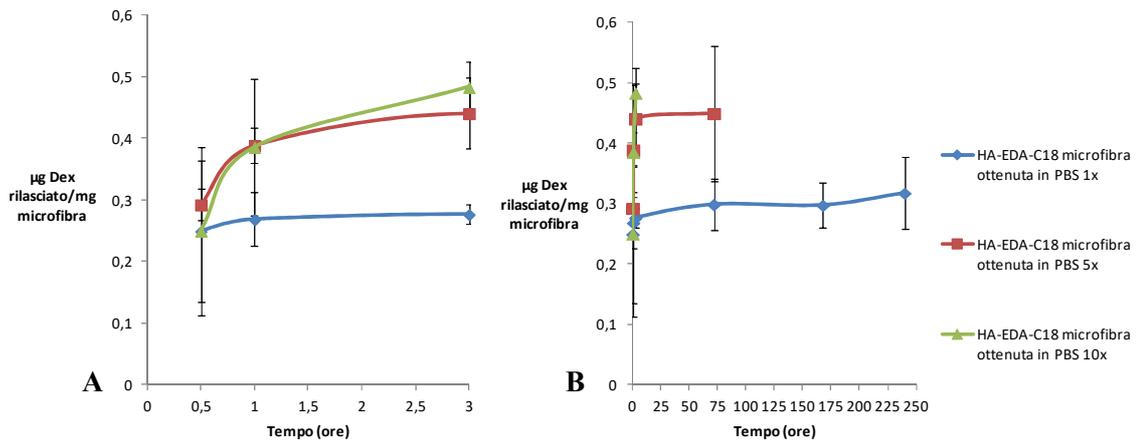
**Figura 27.** Immagini ottenute tramite microscopio ottico delle microfibre di HA-EDA-C<sub>18</sub> appena prodotte in PBS 1x, 5x e 10x e dopo una settimana di immersione in PBS pH 7.4 (A, B, C e A', B', C' rispettivamente). Immagini SEM delle microfibre di HA-EDA-C<sub>18</sub> appena prodotte in PBS 1x, 5x e 10x (A'', B'' e C'' rispettivamente) e dopo una settimana di in PBS pH 7.4 per il campione ottenuto in PBS 1x (A''')

Le microfibre ottenute in PBS 1x apparivano con una morfologia microporosa, invece quelle ottenute in PBS 5x e 10x mostravano una superficie più compatta. Inoltre le microfibre di HA-EDA-C<sub>18</sub> ottenute in PBS 1x, al microscopio ottico apparivano traslucide (Fig. 27A), a differenza di quelle ottenute in PBS 5x e 10x (Fig. 27B e 27C); questo

effetto è dovuto probabilmente alla differente forza ionica del mezzo in cui sono state formate. Dopo la produzione e la conseguente coacervazione, le microfibre di HA-EDA-C<sub>18</sub> ottenute nei PBS a diversa concentrazione salina, sono state immerse in PBS pH 7.4. Dopo una settimana sono state osservate al microscopio ottico e tramite analisi SEM. È stato osservato che in tutti i casi, le microfibre hanno mantenuto delle dimensioni uniformi (come ad esempio diametro costante (circa 400 µm) per l'intera lunghezza della fibra) ed una superficie liscia (**Fig. 27A'**, **27B'** e **27C'**). L'analisi SEM ha mostrato inoltre che le microfibre di HA-EDA-C<sub>18</sub> dopo una settimana di immersione in PBS pH 7.4, apparivano più compatte e meno porose (**Fig. 27A''**).

### **3.3.3 Studi di rilascio dalle microfibre di HA-EDA-C<sub>18</sub> caricate con desametasone**

Le microfibre di HA-EDA-C<sub>18</sub>, ottenute in PBS a diversa concentrazione, hanno mostrato la stessa *drug loading* che quindi, non risulta essere dipendente dalla concentrazione salina del mezzo in cui sono state prodotte, a differenza del profilo di rilascio del farmaco (**Fig. 28**).



**Figura 28.** A) Profili di rilascio in PBS pH 7.4 del Dex dalle microfibre di HA-EDA-C<sub>18</sub> ottenute in PBS 1x, 5x e 10x nelle prime 3 ore; B) profili di rilascio in PBS pH 7.4 del Dex dalle microfibre ottenute in PBS 1x, 5x e 10x fino a 240 ore

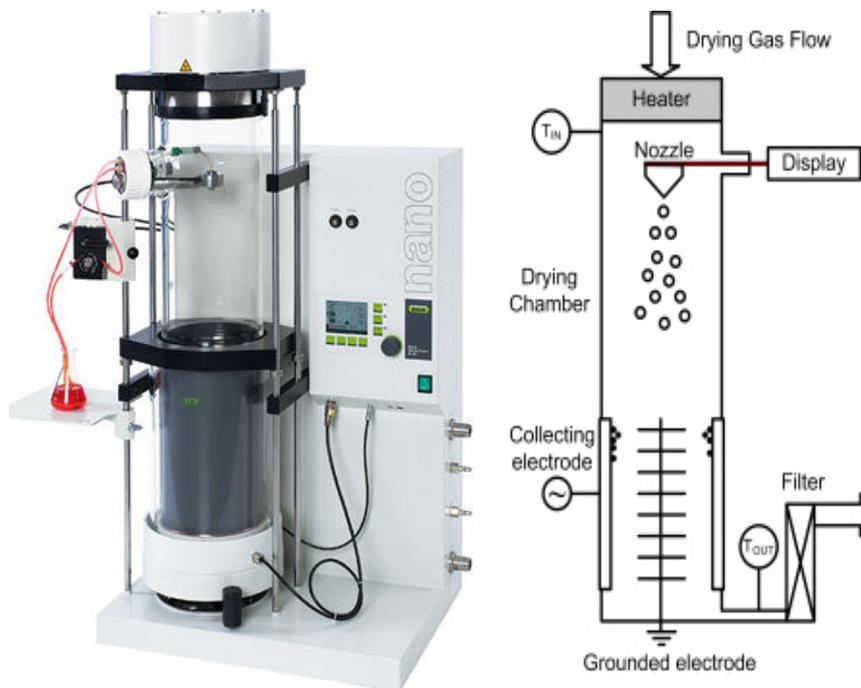
Dopo 0.5 ore, il 70% circa di Dex è stato rilasciato da tutti i tipi di microfibre (non ci sono differenze statisticamente significative,  $p < 0.05$ ). Le microfibre ottenute in PBS 10x e 5x hanno rilasciato, dopo 3 e 72 ore rispettivamente, tutto il farmaco incorporato (**Fig. 27A e 27B**). Invece dopo un iniziale *burst effect*, le microfibre ottenute in PBS 1x hanno rilasciato il farmaco in maniera più lenta (90% del Dex incorporato è stato rilasciato dopo 240 ore) (**Fig. 27B**). Probabilmente, a forza ionica elevata, il polimero si è organizzato rapidamente solo in superficie e le molecole di Dex sono diffuse più velocemente dalle microfibre preparate in PBS 5x e 10x. In PBS 1x invece, il polimero ha formato una struttura più ordinata sia in superficie che all'interno della microfibra con un conseguente rilascio più lento del Dex incorporato.

### 3.4 Microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub>

#### 3.4.1 Produzione di microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub>

Il derivato HA-EDA-C<sub>18</sub> è solubile in acqua o in miscele acqua/solventi polari volatili e insolubile in soluzioni saline come già precedentemente descritto. Questa particolare proprietà dell'HA-EDA-C<sub>18</sub> permette una maggiore versatilità in termini di processo di produzione e di ottenere sistemi di interesse biomedico che presentano un'elevata stabilità in mezzo fisiologico. Particelle di pochi micrometri sono state progettate con lo scopo di massimizzare il contatto cellule-superficie del biomateriale.

Per la produzione delle microparticelle è stato utilizzato il Nano Spray Dryer B-90 (BÜCHI) utilizzando una *spray cap* di 7 µm (**Fig. 29**).



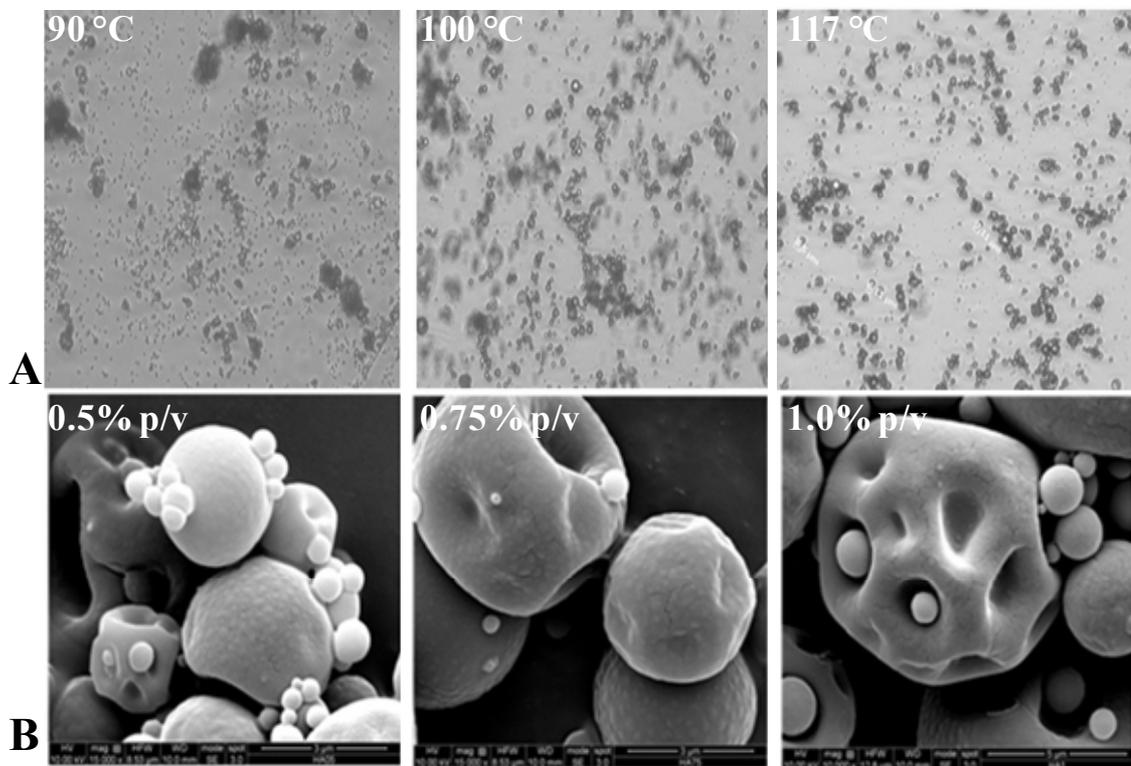
**Figura 29.** Raffigurazione del Nano Spray Dryer B-90 utilizzato per la produzione delle microparticelle e rappresentazione schematica del suo meccanismo di funzionamento

Le teste atomizzatrici di questo particolare Nano Spray Dryer, sono dei sistemi piezoelettrici microporosi, guidati da una frequenza ultrasonica di 60kHz, capaci di generare un aerosol di microgocce con dimensioni controllate. Un flusso laminare di aria calda permette di guidare le particelle dentro un contenitore cilindrico in cui le stesse sono raccolte elettrostaticamente [Dimer F.A. et al., 2015; Heng D. et al., 2011].

L'HA-EDA-C<sub>18</sub> ha una buona affinità verso i solventi polari organici, che quando usati come cosolventi con l'acqua ne migliorano la solubilità e la versatilità per il processo di *spray drying* e per l'incapsulazione di farmaci. In particolare, l'HA-EDA-C<sub>18</sub> è stato solubilizzato in una miscela di acqua/etanolo 1:1 v/v a diverse concentrazioni. È stato osservato che a concentrazioni polimeriche maggiori dell'1% p/v, il Nano Spray Dryer è risultato essere inefficace per atomizzare la dispersione polimerica. Le condizioni ottimali di micronizzazione della soluzione polimerica sono state identificate nelle concentrazioni dello 0.5, 0.75 ed 1.0 % p/v ed operando con temperature interne di 90, 100 e 117 °C. In questo *range* di concentrazione, la resa delle microparticelle è stata di circa il 50-60% rispetto la massa del polimero usato.

### 3.4.2 Caratterizzazione delle microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub>

Per tutte e tre le concentrazioni impiegate, le microparticelle ottenute a 90°C, osservate al microscopio ottico, apparivano non omogeneamente distribuite in termini di dimensioni e si notavano diversi aggregati particellari (Fig. 30A-90°C).



**Figura 30.** A) Immagini al microscopio ottico delle microparticelle ottenute tramite *spray drying* a 90°C, 100 °C e 117 °C partendo da una dispersione polimerica di HA-EDA-C<sub>18</sub> allo 0.75% p/v; B) immagini SEM delle microparticelle ottenute tramite *spray drying* da dispersioni polimeriche di HA-EDA-C<sub>18</sub> a diverse concentrazioni, 0.5, 0.75 e 1% p/v a 117°C

I campioni ottenuti a 100°C e 117°C apparivano più omogenei e non presentavano aggregati particellari.

Le immagini SEM mostrano microparticelle con un diametro di circa 5  $\mu\text{m}$ , con una superficie liscia, non perfettamente sferica dovuta alla presenza di diversi “crateri”, probabilmente a causa dell’impatto di particelle più piccole sulla loro superficie (**Fig. 30B**).

Dopo *swelling* in DPBS pH 7.4, le microparticelle ottenute a 90°C sono risultate significativamente più piccole degli altri campioni per tutte le concentrazioni di HA-EDA-C<sub>18</sub> studiate (diametro medio 8-9  $\mu\text{m}$ ), anche se diversi agglomerati si sono depositati sul fondo del vial. Le microparticelle invece ottenute a 100 e 117 °C, dopo *swelling* avevano un diametro medio compreso tra 12 e 15  $\mu\text{m}$  (**Tabella 2**).

**Tabella 2.** Diametro medio delle microparticelle preparate a differenti concentrazioni e temperature di essiccamento, dopo *swelling* (2 ore) in DPBS pH 7.4

Concentrazione di HA-EDA-C <sub>18</sub> % p/v	Diametro medio ( $\mu\text{m}$ )		
	90°C	100°C	117°C
0.50	8.2 $\pm$ 3.9	12.9 $\pm$ 3.5	11.9 $\pm$ 2.9
0.75	8.5 $\pm$ 2.3	14.67 $\pm$ 3.1	14.5 $\pm$ 3.2
1.00	9.4 $\pm$ 3.3	15.7 $\pm$ 4.3	15.7 $\pm$ 4.3

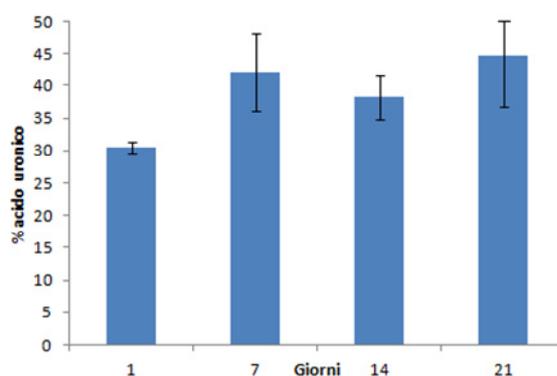
Il campione di microparticelle ottenute da una dispersione polimerica di HA-EDA-C<sub>18</sub> alla concentrazione dello 0.75% p/v ed essiccato a 117°C

(siglato **lotto A**), è stato selezionato per ulteriori caratterizzazioni poiché ha mostrato una distribuzione dimensionale più omogenea.

Dopo 24 e 48 ore di *swelling* in DPBS pH 7.4, le microparticelle **lotto A** hanno mantenuto una distribuzione dimensionale costante con un diametro medio delle particelle di  $16.6 \pm 4$  e  $16.3 \pm 3$   $\mu\text{m}$ , rispettivamente.

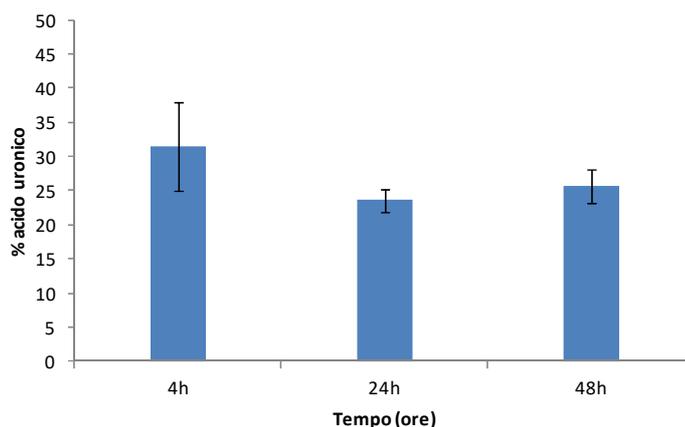
Gli studi di idrolisi nel tempo per le microparticelle **lotto A**, sono stati eseguiti valutando la quantità di acido uronico rilasciato in DPBS pH 7.4.

Nella **figura 31**, si può notare un aumento statisticamente significativo di acido uronico rilasciato dopo 1 giorno (30% di acido uronico rilasciato) e 7 giorni di analisi (40% di acido uronico rilasciato) ( $p < 0.05$ ). Con il passare del tempo non è stato osservato un ulteriore aumento in acido uronico rilasciato.



**Figura 31.** Grafico della percentuale di acido uronico rilasciato dalle microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub> **lotto A** in DPBS (pH 7.4) dopo 1, 7, 14 e 21 giorni

Inoltre, non sono state osservate differenze statisticamente significative nel rilascio di acido uronico per le stesse microparticelle in presenza di ialuronidasi alla concentrazione di 30 U/ml durante il periodo di analisi (Fig. 32).



**Figura 32.** Grafico della percentuale di acido uronico rilasciato dalle microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub> lotto A in DPBS pH 7.4 in presenza di ialuronidasi alla concentrazione di 30 U/mL dopo 4, 24 e 48 ore

I valori di *swelling* fino a 48 ore e la percentuale dell'acido uronico rilasciata, determinata tramite analisi al carbazolo, hanno evidenziato l'ottima stabilità delle microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub> in mezzo fisiologico.

L'HA nativo di solito è *spray-dried* a temperature comprese tra 120 e 160°C partendo da dispersioni polimeriche in acqua o acqua/etanolo (per incapsulare farmaci idrofobici) a concentrazioni comprese tra 1 e 4% p/v (spesso con l'aggiunta di plasticizzanti) [Fatnassi M. et al., 2014; Huh Y. et al., 2010]. La velocità di dissoluzione dell'HA dalle microparticelle così ottenute è influenzata in genere dal peso molecolare del polimero e dalla

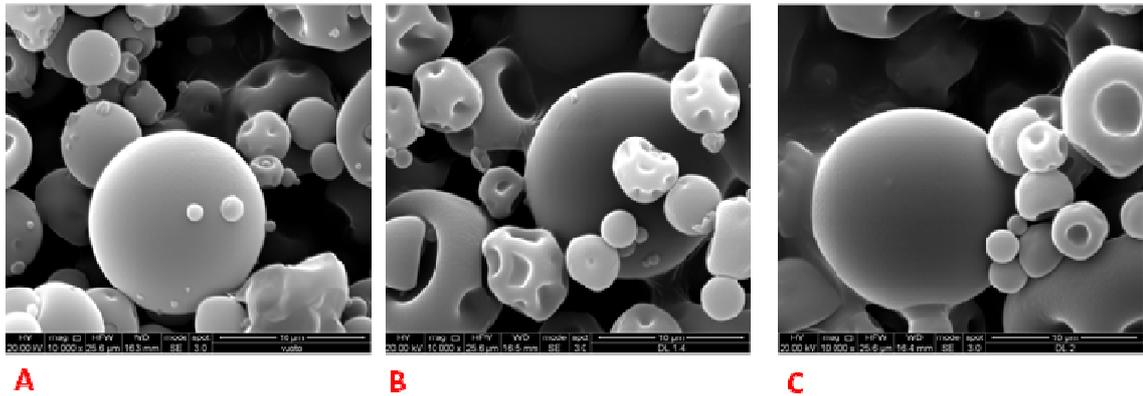
presenza di additivi, ma normalmente sia la dissoluzione che il rilascio dei farmaci incapsulati avviene in poche ore. Se si volesse estendere per un periodo di tempo più prolungato la stabilità in mezzo fisiologico, le microparticelle di solo HA devono essere reticolate chimicamente.

Le microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub> ottenute in questo studio, sono invece stabili alla dissoluzione nei mezzi salini senza la necessità di additivi o reticolanti chimici.

### **3.4.3 Produzione di microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub> caricate con desametasone e studi di rilascio**

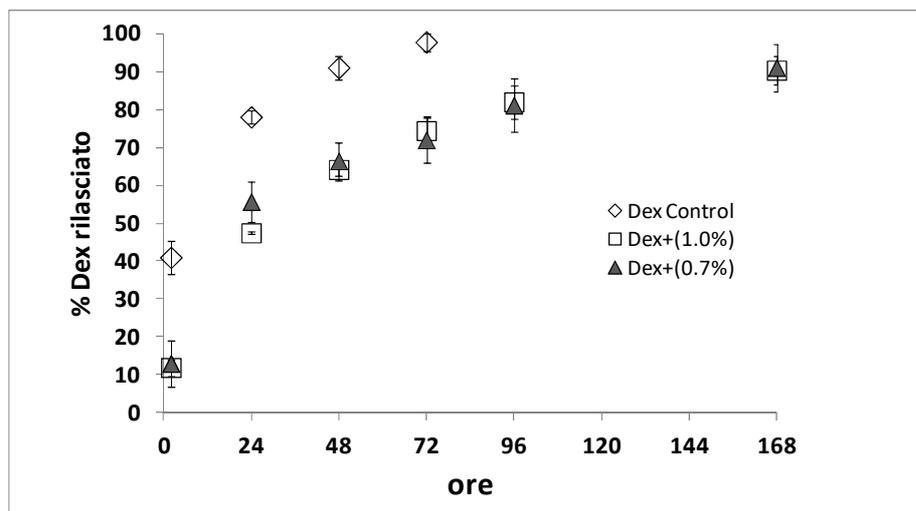
I *coil* idrofobici possono essere sfruttati per il caricamento di farmaci idrofobi e per prolungarne il loro rilascio, come già dimostrato per le spugne e le microfibre di HA-EDA-C<sub>18</sub> (paragrafi 3.2.7 e 3.3.3). Il Dex è stato scelto considerando il suo effetto condrostimolante sulle cellule staminali mesenchimali [Tangtrongsup S. e Kisiday J.D., 2016; Shintani N. e Hunziker E.B., 2011] e rappresenta una molecola modello per dimostrare l'aumentata capacità delle microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub> di incapsulare effettori idrofobici.

Sono stati prodotti lotti di microparticelle caricate con Dex alla concentrazione dello 0.7 e 1% p/p (siglati **Dex+(0.7%)** e **Dex+(1.0%)** rispettivamente). L'analisi SEM ha evidenziato come le microparticelle caricate con il farmaco apparivano simili a quelle del **lotto A (Fig. 33)**.



**Figura 33.** Analisi SEM sulle microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub> caricate con desametasone. **A)** microparticelle vuote (**lotto A**); **B)** microparticelle caricate con 0.7 % p/p di Dex (**Dex+(0.7%)**); **C)** microparticelle caricate con 1.0 % p/p di Dex (**Dex+(1.0%)**)

È stato osservato inoltre un rilascio controllato del farmaco dalle microparticelle **Dex+(0.7%)** e **Dex+(1.0%)** rispetto al controllo (dissoluzione Dex in DPBS pH 7.4). I profili di rilascio ottenuti dalle microparticelle **Dex+(0.7%)** e **Dex+(1.0%)** sono sovrapponibili (**Fig. 34**).



**Figura 34.** Profili di rilascio del Dex dalle microparticelle **Dex+(0.7%)** e **Dex+(1.0%)** in DPBS pH 7.4 e profilo di dissoluzione del farmaco libero (desametasone controllo)

Come osservato dal confronto diretto con la dissoluzione del Dex, la presenza delle catene idrofobiche di ottadecilammina ha migliorato l'affinità per il farmaco consentendo un rilascio controllato fino ad una settimana.

#### **3.4.4 Funzionalizzazione delle microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub> con cy-RGDC e con TGF- $\beta$ 3**

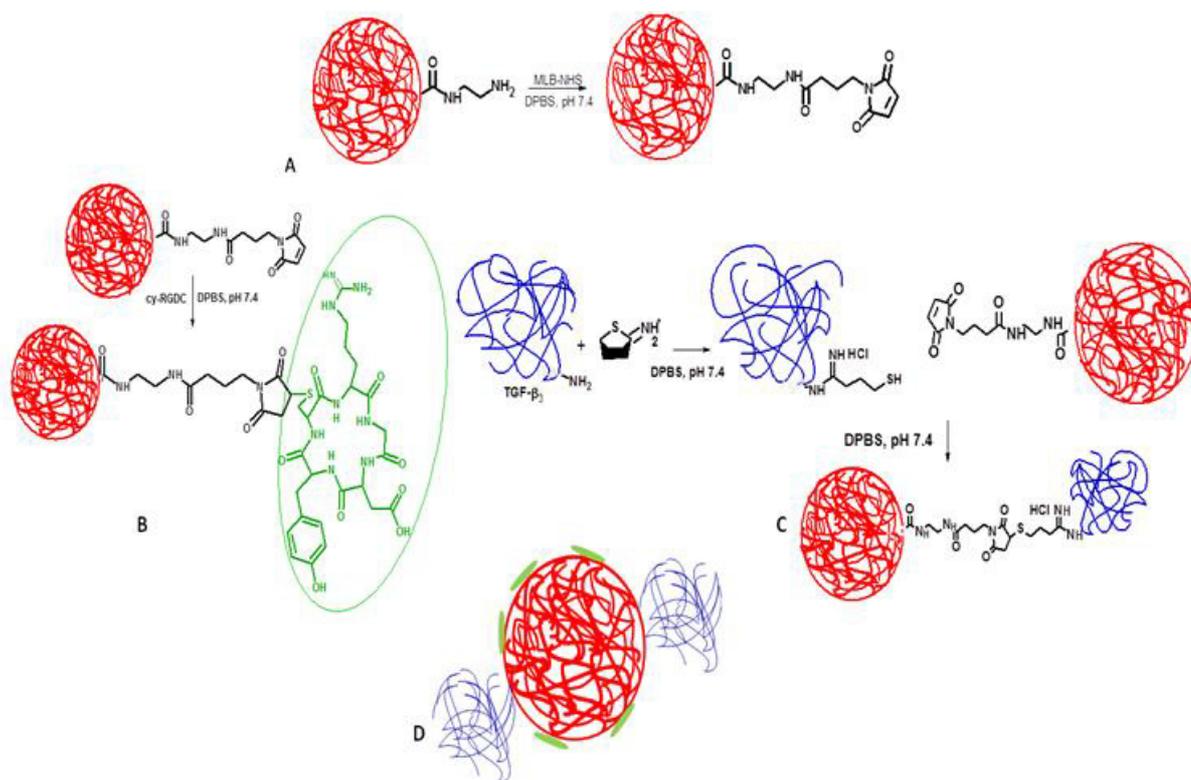
I fattori di crescita possono esercitare la loro azione sia se diffusi nell'ambiente extracellulare, sia se legati ad un biomateriale.

La libera diffusione dei fattori di crescita presenta degli svantaggi dovuti a possibili denaturazioni durante la diffusione e alla necessità di caricare quantità relativamente elevate di queste proteine nel biomateriale se è desiderato un effetto prolungato [Hajimiri M. et al., 2015].

L'immobilizzazione del fattore di crescita rappresenta invece, una buona possibilità per prolungarne il suo effetto biologico limitando la quantità totale di proteina da impiegare [Masters K.S., 2011]. Inoltre, legando il fattore di crescita al biomateriale non si registrano danni sulla stabilità della proteina e sulla sua attività biologica. L'interazione con il substrato può essere quindi prolungata e anche la stabilità del biomateriale è mantenuta.

Legare alle microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub> fattori bio-adesivi e fattori di crescita, potrebbe rappresentare quindi una metodica per permettere una maggiore efficienza nell' "istruzione cellulare".

A tale scopo, l'acido maleimmidobutirrico è stato scelto come opportuno spaziatore chemio-selettivo per legare bio-effettori aventi un gruppo tiolico, come il cy-RGDC e il TGF- $\beta$ 3 modificato con il 2-immnotiolano. Sfruttando la reattività del gruppo etilendiamminico dell'HA-EDA- $C_{18}$ , lo *spacer* maleimmidico è stato legato direttamente alle microparticelle, come illustrato nella **figura 35**.



**Figura 35.** A) Rappresentazione del legame di MLB-NHS alle microparticelle; B) procedura di legame del cy-RGDC; C) procedura schematica per la funzionalizzazione del TGF- $\beta$ 3 con un gruppo tiolico usando il 2-immnotiolano e successivo legame alle microparticelle; D) rappresentazione schematica delle microparticelle funzionalizzate con cy-RGDC e TGF- $\beta$ 3

Le analisi ATR-FTIR eseguite sulle particelle funzionalizzate con MLB-NHS hanno evidenziato la comparsa di un picco a  $1707\text{ cm}^{-1}$  attribuibile allo *stretching* del gruppo  $\text{-HC=CH-}$  della maleimmide.

La funzionalizzazione delle microparticelle con cy-RGDC è stata eseguita in DPBS pH 7.4 (**Fig. 35B**).

Per controllare la quantità di cy-RGDC legata sulle microparticelle, le stesse sono state funzionalizzate con tre diversi rapporti in peso tra MLB-NHS e microparticelle (0.09, 0.18 e 0.27) (**Tabella 3**).

**Tabella 3.** Rapporti in peso impostati tra MLB-NHS e microparticelle e quantità di cy-RGDC legata per mg di microparticella per i lotti **cyRGDC+(a)**, **cyRGDC+(b)** e **cyRGDC+(c)** e per i lotti funzionalizzati anche con TGF- $\beta$ 3 (**TGF $\beta$ 3+;cyRGDC+**)

Lotti di microparticelle	Rapporto MLB-NHS/ microparticelle (p/p)	Quantità di cyRGDC legata/microparticelle (p/p)	Quantità di TGF- $\beta$ 3 legata/ microparticelle (p/p)
cyRGDC+(a)	0.09	0.034 $\pm$ 0.003	/
cyRGDC+(b)	0.18	0.118 $\pm$ 0.012	/
cyRGDC+(c)	0.27	0.125 $\pm$ 0.017	/
TGF $\beta$ 3+;cyRGDC+	0.18	0.10 $\pm$ 0.016	4 x 10 <sup>-5</sup>

Negli spettri ATR-FTIR dei lotti di microparticelle **cyRGDC (a)**, **(b)** e **(c)**, è stata osservata la scomparsa del picco relativo al gruppo insaturo maleimmidico, suggerendo così l'assenza di gruppi maleimmidici non reagiti dopo la funzionalizzazione con cy-RGDC. All'aumentare del

rapporto in peso tra MLB-NHS e microparticelle da 0.09 a 0.18, il rapporto in peso tra il cy-RGDC legato e le microparticelle aumenta da 0.034 a 0.118. Un ulteriore aumento in MLB-NHS non ha prodotto un aumento statisticamente significativo della quantità di cy-RGDC legata (**Tabella 3**) suggerendo che è stata raggiunta la saturazione dei gruppi maleimmidici.

Considerando inoltre, l'elevata quantità di MLB legato per massa di microparticella, è ragionevole supporre che la funzionalizzazione avviene attraverso l'intero volume della microparticella e non solamente sulla superficie. Una volta legato, il gruppo maleimmidico rappresenta un ottimo *linker* per i bio-effettori portanti gruppi tiolici che possono essere legati attraverso un addizione di *Michael*, una reazione veloce, efficiente e selettiva che avviene in mezzo acquoso tamponato a pH 7.4.

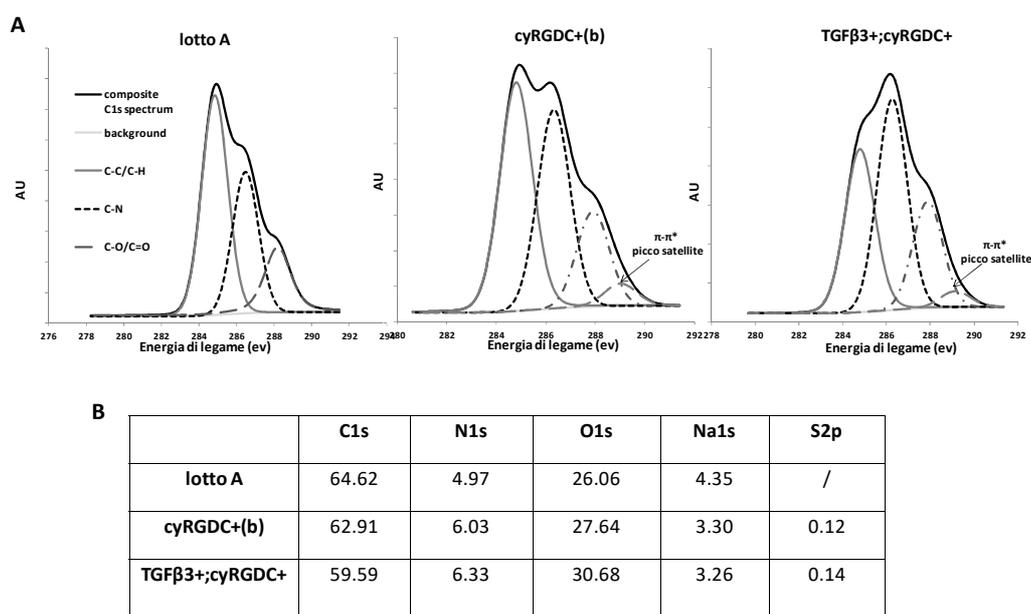
Il TGF- $\beta$ 3 è stato modificato tramite il reattivo di Traut (imminotiolano), seguendo la procedura riportata in letteratura [Shintani N. e Hunziker E.B., 2011]. Questa procedura permette di funzionalizzare gruppi  $-NH_2$  delle proteine tramite il 2-imminotiolano, con lo scopo di introdurre un gruppo tiolico.

Dopo attivazione, il TGF- $\beta$ 3 è stato legato alle microparticelle funzionalizzate con MLB (0.18 p/p) in DPBS pH 7.4 (**Fig. 35C**). Il test ELISA, effettuato dopo la reazione, ha suggerito che tutto il TGF- $\beta$ 3 impiegato (400 ng), è stato legato. Le microparticelle funzionalizzate con cy-RGDC e TGF- $\beta$ 3 sono state ottenute effettuando le reazioni di

funzionalizzazione in sequenza (**Fig. 35B, C e D**). Dopo questa serie di reazioni, non si è verificata una riduzione statisticamente significativa del cy-RGDC legato alle microparticelle già funzionalizzate con TGF- $\beta$ 3 (**Tabella 3**).

### 3.4.6 Analisi XPS sulle microparticelle

La **figura 36** mostra gli spettri deconvoluti C1s dei campioni di microparticelle: **lotto A**, **cyRGDC+(b)** e **TGF $\beta$ 3+;cyRGDC+**.



**Figura 36.** Analisi XPS condotta sulle microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub> (**lotto A**) e sulle microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub> funzionalizzate con cy-RGDC (**cyRGDC+(b)**), con cy-RGDC e con TGF- $\beta$ 3 (**TGF $\beta$ 3+;cyRGDC+**). **A**) Spettro del C1s composito e deconvoluto; **B**) composizione elementare espressa come % di atomi

Sulle microparticelle **lotto A**, è stata evidenziata un'abbondanza relativa di legami C-H/C-C (energia di legame 284.5 eV) rispetto a legami C-N e

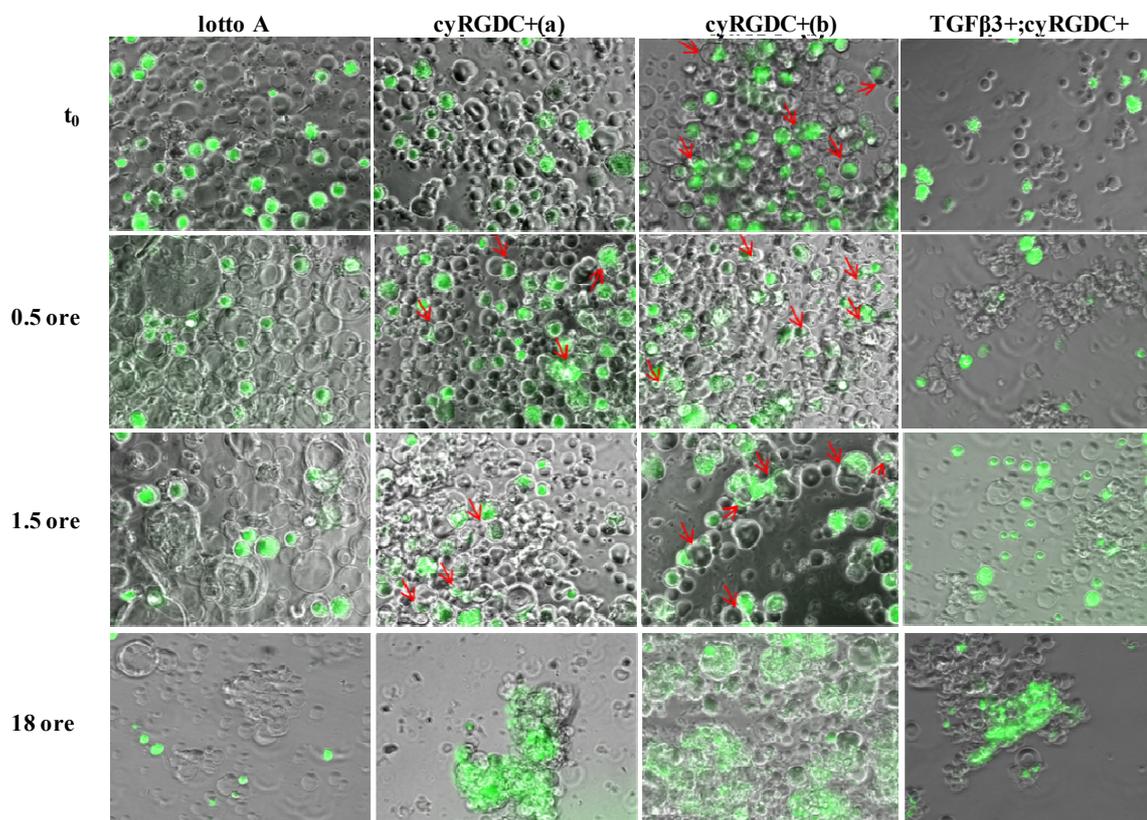
C-O/C=O. Tale abbondanza di legami alifatici su una microparticella a struttura polisaccaridica, ha confermato la presenza delle porzioni C<sub>18</sub>. Un progressivo incremento dell'abbondanza di legami C-N rispetto a legami C-O/C=O è stato notato invece, per le microparticelle **cyRGDC+(b)** e **TGFβ3+;cyRGDC+**. Inoltre nel loro spettro XPS, è stata evidenziata la presenza del picco satellite  $\pi-\pi^*$  a 290 eV, indicativo di funzionalità aromatiche, attribuibili all'amminoacido fenilalanina presente sia nel cy-RGDC che nel TGF-β3 (**Fig. 36A**). Sono state rilevate inoltre delle sensibili differenze tra le microparticelle **TGFβ3+;cyRGDC+** e le microparticelle **cyRGDC+(b)**. La riduzione significativa nell'abbondanza relativa in catene alchiliche, mostrata attraverso lo spettro C1s delle microparticelle **TGFβ3+;cyRGDC+** rispetto al campione **cyRGDC+(b)**, è in accordo con la presenza del TGF-β3 nelle microparticelle.

L'analisi elementare ha inoltre evidenziato la comparsa dello zolfo nel campione di microparticelle **cyRGDC+(b)** e **TGFβ3+;cyRGDC+** (**Fig. 36B**).

### 3.4.6 Studi di adesione e formazione degli aggregati BM-hMSC/microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub>

La formazione degli aggregati BM-hMSC/microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub> è stata osservata tramite analisi al microscopio a fluorescenza, colorando le BM-hMSC con *Cell Tracker Green* (Fig. 37).

Sono stati studiati gli aggregati tra le cellule e le microparticelle **lotto A**, **cyRGDC+(a)**, **cyRGDC+(b)** e **TGFβ<sub>3</sub>+;cyRGDC+**.



**Figura 37.** Studi dell'aggregazione tra le BM-hMSC e le microparticelle: **lotto A**, **cyRGDC+(a)**, **cyRGDC+(b)** e **TGFβ<sub>3</sub>+;cyRGDC+**, valutata tramite microscopio a fluorescenza tra 0 e 18 ore. Le microparticelle sono state sospese con le BM-hMSC colorate e il tutto è stato mantenuto in agitazione per 18 ore. Le frecce rosse evidenziano le cellule adese sulle microparticelle

Le BM-hMSC non hanno aderito sulle microparticelle **lotto A** neanche dopo 18 ore.

La funzionalizzazione delle microparticelle con cy-RGDC ha migliorato invece l'adesione delle BM-hMSC sulle stesse microparticelle (vedi le frecce rosse in **figura 37** nei lotti **cyRGDC+(a)** e **cyRGD+(b)**). Dopo 18 ore, sono osservabili diversi *cluster* cellule/microparticelle per i lotti **cyRGDC+(a)** e **cyRGD+(b)**. Invece, per il lotto **TGFβ3+;cyRGDC+**, sono stati osservati solamente pochi aggregati durante le prime ore dell'esperimento, dopo 18 ore però, il numero e le dimensioni di questi microaggregati è aumentato in maniera apparentemente simile a quanto osservato per i campioni di microparticelle **cyRGDC+(a)** e **cyRGDC+(b)**.

Questo studio dell'aggregazione tra le BM-hMSC e le microparticelle, ha rilevato come il cy-RGDC legato alle microparticelle influenzi direttamente l'adesione cellulare. L'adesione, per i lotti **cyRGDC+(a)** e **cyRGDC+(b)** avviene già durante la prima ora e mezza di esperimento, quando le microparticelle e le cellule sono mantenute in sospensione attraverso una continua agitazione e ripetute ri-sospensioni. Le microparticelle non funzionalizzate non hanno mostrato capacità adesive verso le cellule in accordo con le proprietà "anti-adesive" dell'HA.

Invece, è stata osservata una bassa aggregazione durante le prime ore del test per le microparticelle **TGFβ3+;cyRGDC+**. Tenendo conto dei dati sulla quantità di cy-RGDC legata, delle analisi XPS e degli studi di aggregazione,

si può supporre che per il lotto **TGFβ3+;cyRGDC+** vi sia stata una riduzione del cy-RGDC disponibile per l'interazione con le cellule dovuta all'ingombro sterico del TGF-β3. Questo effetto quindi ha rallentato l'adesione cellulare ma non ha impedito la formazione degli aggregati dopo 18 ore di coltura.

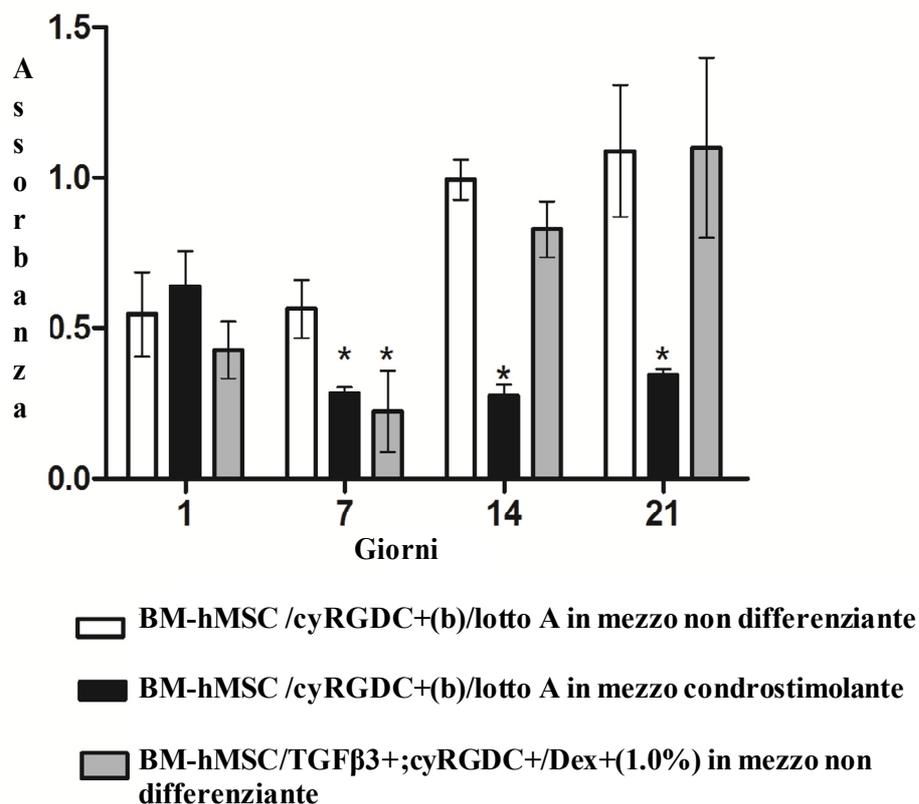
### **3.4.7 Coltura degli aggregati BM-hMSC/microparticelle HA-EDA-C<sub>18</sub>**

Per ottenere un *setting* sperimentale nel quale le BM-hMSC fossero stimulate dal Dex e dal TGF-β3, le cellule sono state coltivate in mezzo non differenziante con le microparticelle **TGFβ3+;cyRGDC+** e **Dex+(1.0%)** in rapporto p/p 70:30. Le BM-hMSC sono state coltivate anche con le microparticelle **cyRGDC+(b)** e **lotto A** in rapporto p/p 70:30, in mezzo non differenziante e condro-stimolante.

I risultati del saggio MTS sono riportati in **figura 38**. Dopo 1 giorno di coltura, non sono state osservate differenze statisticamente significative ( $p < 0.05$ ) tra i campioni studiati, confermando così che il TGF-β3 legato non riduce né il numero di cellule reclutate né la formazione degli aggregati BM-hMSC/microparticelle.

Dopo 7 giorni, si è osservata invece una riduzione statisticamente significativa dell'attività metabolica per gli aggregati BM-hMSC/**cyRGDC+(b)/lotto A** coltivati nel mezzo condro-stimolante e per gli aggregati BM-hMSC/**TGFβ3+;cyRGDC+/Dex+(1.0%)**.

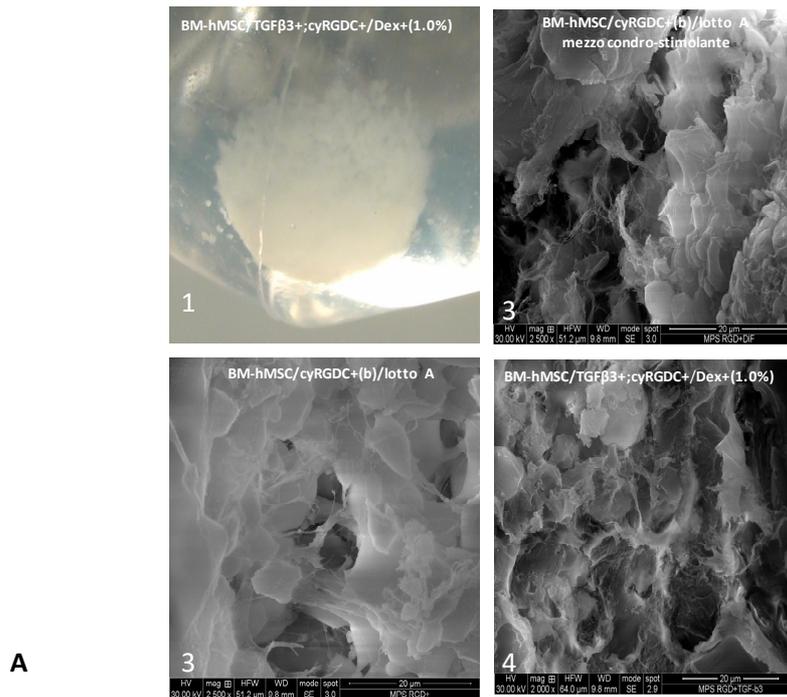
Dopo 14 e 21 giorni, l'attività metabolica degli aggregati BM-hMSC/cyRGDC+(b)/lotto A coltivati nel mezzo condro-stimolante, si è mantenuta molto più bassa se paragonata a quella degli altri campioni coltivati nel mezzo non differenziante. Probabilmente, la presenza continua di agenti condrogenici nell'ambiente di coltura (il mezzo è stato cambiato ogni 3 giorni come riportato nella parte sperimentale) ha influenzato il comportamento cellulare.



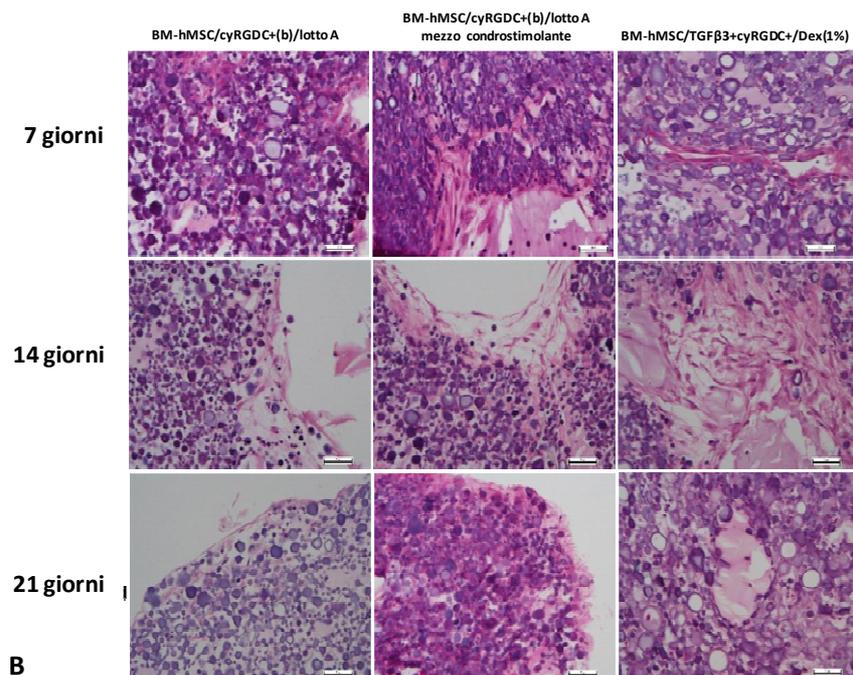
**Figura 38.** Saggio MTS eseguito sugli aggregati BM-hMSC/cyRGDC+(b)/lotto A coltivati in mezzo non differenziante e in mezzo condro-stimolante e sugli aggregati BM-hMSC/TGFβ3+;cyRGDC+/Dex+(1.0%) coltivati in mezzo non differenziante. I risultati sono espressi come valore di assorbanza in funzione del tempo di coltura

I risultati hanno suggerito che gli aggregati BM-hMSC/cyRGDC+(b)/lotto A e quelli BM-hMSC/TGFβ3+;cyRGDC+(b)/Dex+(1.0%), coltivati in mezzo non differenziante, hanno permesso un aumento dell'attività metabolica delle BM-hMSC durante l'esperimento.

Le analisi SEM degli aggregati dopo 21 giorni di coltura e i risultati della colorazione H&E dopo 7, 14 e 21 giorni sono riportati nelle figure 39 A e B rispettivamente. Dopo 7 giorni di coltura, gli aggregati apparivano come *scaffold* 3D della stessa forma del Falcon dove è stata eseguita la coltura (in figura 39A è stato riportato come esempio l'aggregato BM-hMSC/TGFβ3+;cyRGDC+/Dex+(1.0%)). Le immagini SEM hanno mostrato la formazione di aggregati compatti cellule/microparticelle in cui non sono chiaramente distinguibili le une dalle altre. Non sono state osservate significative differenze tra i campioni analizzati. Invece, sono chiaramente distinguibili le cellule e le microparticelle quando osservate dopo colorazione H&E (Fig. 39B). Dal 7° al 21° giorno, in tutti i campioni analizzati (BM-hMSC/cyRGDC+(b)/lotto A coltivati in mezzo non differenziante e in mezzo condro-stimolante e BM-hMSC/TGFβ3+;cyRGDC+/Dex+(1.0%) coltivati in mezzo non differenziante) le cellule apparivano con una forma allungata ed omogeneamente distribuite tra le microparticelle.



**A**



**B**

**Figura 39.** **A)** Immagini degli aggregati: **1)** immagine dell'aggregato BM-hMSC/TGFβ3+;cyRGDC+/Dex+(1.0%) dopo 7 giorni di cultura in mezzo non differenziante; **2)** immagine SEM dell'aggregato BM-hMSC/cyRGDC+(b)/lotto A coltivato in mezzo condro-stimolante, **3)** immagine SEM dell'aggregato BM-hMSC/cyRGDC+(b)/lotto A coltivato in mezzo non differenziante **4)** immagine SEM dell'aggregato BM-hMSC/TGFβ3+;cyRGDC+/Dex+(1.0%) coltivato in mezzo non differenziante. **B)** colorazione H&E sugli aggregati BM-hMSC/cyRGDC+(b)/lotto A coltivati in mezzo non differenziante, BM-hMSC/cyRGDC+(b)/lotto A coltivati in mezzo condro-stimolante e BM-hMSC/TGFβ3+;cyRGDC+/Dex+(1.0%) coltivati in mezzo non differenziante

Il saggio H&E ha mostrato un'elevata connessione tra le cellule e le microparticelle negli aggregati (**Fig. 39B**), perfino nel campione BM-hMSC/TGF $\beta$ 3+;cyRGDC+/Dex+(1.0%), confermando così che la bassa aggregazione osservata per questo campione durante le prime 18 ore dello studio di aggregazione non ha avuto effetto sulla capacità delle microparticelle di interagire con le BM-hMSC.

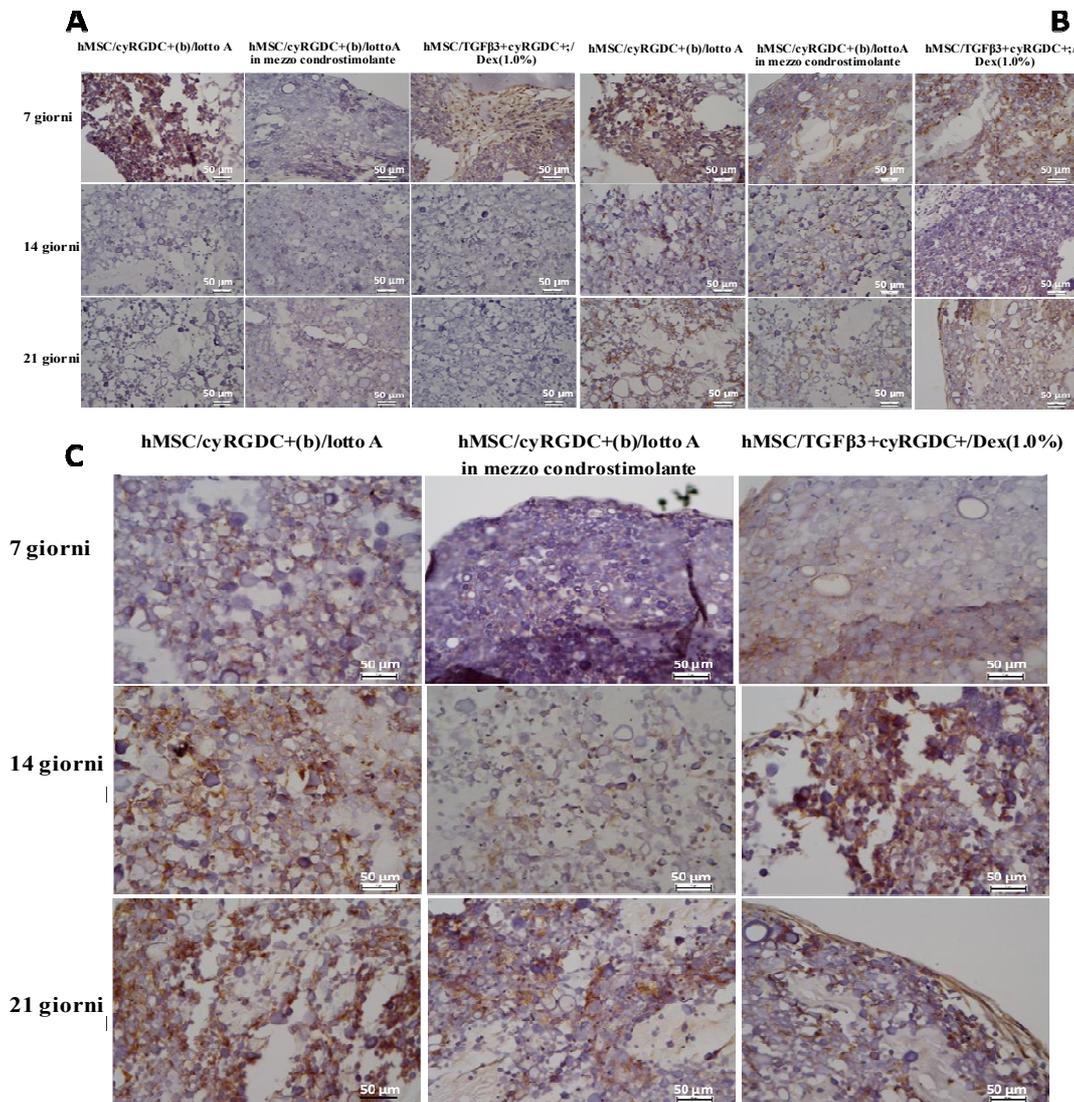
### 3.4.8 Analisi istologica

L'espressione dei *marker* di superficie CD 105 e CD 90 per l'identità staminale è stata valutata sui complessi cellule/microparticelle dopo 7, 14 e 21 giorni di coltura.

Come osservabile in **figura 40A**, dopo 7 giorni di coltura, gli aggregati BM-hMSC/cyRGDC+(b)/lotto A e gli aggregati BM-hMSC/TGF $\beta$ 3+;cyRGDC+/Dex+(1.0%), entrambi coltivati in mezzo di coltura non differenziante, sono risultati positivi per il CD 90, l'espressione di tale *marker* si è ridotta progressivamente dopo 14 e 21 giorni di coltura.

L'espressione del *marker* CD 105 è apparsa più intensa per gli aggregati BM-hMSC/cyRGDC+(b)/lotto A rispetto agli aggregati BM-hMSC/TGF $\beta$ 3+;cyRGDC+/Dex+(1.0%) dopo 7 giorni di coltura in mezzo non differenziante (**Fig. 40B**).

Invece l'espressione di entrambi i *marker*, negli aggregati BM-hMSC/cyRGDC+(b)/lotto A coltivati nel mezzo di differenziamento condrogenico già dopo 7 giorni è risultata negativa (**Fig. 40 A e B**).



**Figura 40.** Analisi istologica dopo 7, 14 e 21 giorni di coltura sugli aggregati: BM-hMSC/cyRGDC+(b)/lotto A coltivati in mezzo non differenziante, BM-hMSC/cyRGDC+(b)/lotto A coltivati in mezzo condrostimolante e BM-hMSC/TGFβ3+;cyRGDC+/**Dex+(1.0%)** coltivati in mezzo non differenziante. **A)**: analisi del CD 90 (colorato in marrone); **B)**: analisi del CD 105 (colorato in marrone), **C)**: analisi del collagene di tipo II (colorato in marrone)

Le analisi istologiche per l'espressione dei *marker* CD 105 e CD 90 hanno suggerito che le BM-hMSC hanno perso la loro identità staminale durante il periodo di coltura in vitro in tutti i campioni studiati.

Le BM-hMSC negli aggregati **cyRGDC+(b)/lotto A** coltivati in mezzo condrogenico e quelle negli aggregati **TGFβ3+;cyRGDC+/Dex+(1.0%)** coltivati in mezzo di coltura non differenziante hanno perso la loro identità staminale già dopo 7 giorni (**Fig. 40B**) a differenza delle BM-hMSC negli aggregati **cyRGDC+(b)/lotto A** coltivate in mezzo non differenziante che perdono la loro identità staminale dopo 14 giorni, suggerendo così che la presenza del TGF-β3 e del Dex velocizza il differenziamento delle staminali. La produzione di collagene di tipo II è stata bassa per tutti i campioni analizzati dopo 7 giorni di coltura. Dopo 21 giorni dallo studio, tutti gli aggregati hanno mostrato la presenza del collagene di tipo II e non sono state osservate differenze statisticamente significative tra i vari campioni in termini di produzione dello stesso, suggerendo così che sia gli aggregati **cyRGDC+(b)/lotto A** coltivati in mezzo di coltura non differenziante che gli aggregati **TGFβ3+;cyRGDC+/Dex+(1.0%)** coltivati anch'essi in mezzo non differenziante sono in grado di indirizzare le BM-hMSC in un iniziale differenziamento verso un fenotipo condrocitario senza necessità di usare un mezzo di coltura condro-stimolante. Questi risultati sono in accordo con dati riportati in letteratura che indicano che i mediatori di legame delle integrine (come ad esempio il peptide RGD) possono stimolare le hMSC verso il

differenziamento condrogenico [Re'em T. et al., 2010; Salinas C.N. e Anseth K.S., 2008].

Inoltre, altri risultati riportati in letteratura suggeriscono che l'HA è in grado di promuovere l'espressione di *marker* condrogenici [Wu S.C. et al., 2013; Chung C. e Burdick J.A., 2009] e quindi dai risultati ottenuti si può affermare che l'HA-EDA-C<sub>18</sub> ha mantenuto la capacità condro-stimolante dell'HA nativo. Chiaramente sono necessarie delle analisi più approfondite sui *marker* condrogenici per confermare il potenziale effetto condrogenico del TGF-β<sub>3</sub> [Kim M. et al., 2012; Bhang S.H. et al., 2011] e del Dex caricato nelle microparticelle.

### **3.5 Microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub> reticolate chimicamente**

#### **3.5.1 Produzione delle microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub>**

Le microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub> utilizzate per la reticolazione chimica sono state ottenute come riportato nel paragrafo 5.6.1, ovvero da una dispersione polimerica di HA-EDA-C<sub>18</sub> alla concentrazione di 0.75% p/v in acqua/etanolo 1:1 v/v utilizzando il Nano Spray Dryer B-90 (BÜCHI) ad una temperatura di 117°C.

### 3.5.2 Procedura di reticolazione chimica delle microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub>

La procedura di reticolazione chimica che è stata ideata per ottenere il legame covalente microparticella-microparticella sfrutta l'addizione di *Michael* tra un gruppo tiolico e una porzione maleimmidica. Questo tipo di reticolazione chimica ha il vantaggio di essere del tutto biocompatibile e altamente selettiva in condizioni di pH fisiologico [Shu X.S. et al., 2004].

A tale scopo, un lotto di microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub> è stato funzionalizzato con una porzione tiolica ed un altro lotto funzionalizzato con una porzione maleimmidica.

Il lotto di microparticelle funzionalizzato con la porzione tiolica è stato ottenuto tramite reazione con il 2-imminotiolano idrocloruro, seguendo una procedura chimica riportata in letteratura [Shintani N. e Hunziker E.B., 2011] e utilizzata in questo lavoro di tesi anche per funzionalizzare il TGF-β<sub>3</sub> con un gruppo tiolico (vedi paragrafo 5.6.4). Questo procedimento, come già indicato, permette di funzionalizzare gruppi -NH<sub>2</sub> di proteine o polimeri naturali o sintetici in tampone a pH 7.4 (**Fig. 41A**).

Come riportato in **tabella 4**, sono state aggiunte  $3.17 \times 10^{-4}$  mmol di 2-imminotiolano idrocloruro per milligrammo di microparticelle e tramite il saggio di Ellman, descritto nel paragrafo 5.7.2, è stata determinata la quantità di 2-imminotiolano legata ( $4.24 \times 10^{-5} \pm 1.10 \times 10^{-5}$  mmol) che ha

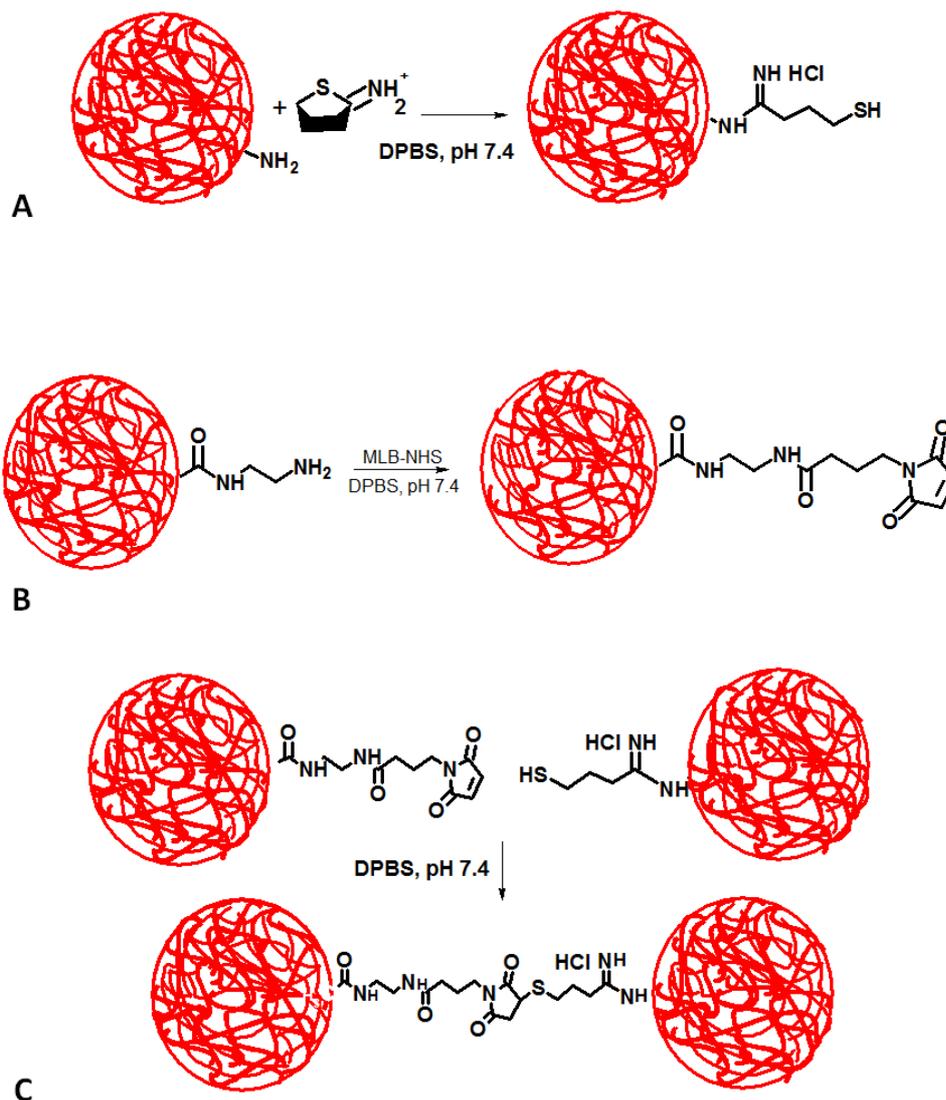
permesso di ottenere il dato relativo all'efficienza di legame, corrispondente al  $13.45 \pm 3.52$  %.

**Tabella 4.** Quantificazione di 2-iminotiolano legato alle microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub>

Campione	mmol 2-iminotiolano aggiunte	mmol 2-iminotiolano legate	efficienza di legame %
1mg di microparticelle HA-EDA-C <sub>18</sub>	$3.16 \times 10^{-4}$	$4.24 \times 10^{-5} \pm 1.10 \times 10^{-5}$	$13.45 \pm 3.52$

Un altro lotto di microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub> è stato funzionalizzato inserendo la porzione maleimmidica (**Fig. 41B**).

Sono stati ottenuti due lotti di microparticelle con diverso grado di funzionalizzazione in MLB-NHS, siglati come **lotto A** (minor grado di funzionalizzazione teorico impostato) e **lotto B** (maggior grado di funzionalizzazione teorico impostato). Dall'analisi ATR-FTIR operata sulle microparticelle funzionalizzate con MLB-NHS si nota la presenza di un picco a  $1707 \text{ cm}^{-1}$ , attribuibile allo *stretching* del doppio legame maleimmidico.



**Figura 41.** **A)** Funzionalizzazione delle microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub> con 2-imminotiolano; **B)** Funzionalizzazione delle microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub> con MLB-NHS; **C)** Schematizzazione della procedura di reticolazione chimica

La procedura di reticolazione tra le microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub> funzionalizzate con 2-imminotiolano e quelle funzionalizzate con MLB-NHS **lotto B**, (**Fig. 41C**) è stata effettuata miscelando i due lotti di microparticelle attraverso una rapida agitazione con il vortex.

Il peptide cy-RGDC è stato scelto per conferire proprietà bioadesive al sistema microparticellare. La strategia di funzionalizzazione ha previsto

l'aggiunta del cy-RGDC soltanto dopo l'avvio della procedura di reticolazione chimica tra i due lotti di microparticelle.

Come riportato in **tabella 5**, sono state aggiunte  $1.62 \times 10^{-4}$  mmol di cy-RGDC per milligrammo di microparticelle funzionalizzate con MLB-NHS **lotto B** e l'analisi del mezzo di sospensione dell'aggregato microparticellare tramite HPLC ha consentito di valutare la quantità di cy-RGDC legata ( $1.42 \times 10^{-4} \pm 6.20 \times 10^{-6}$  mmol), e di calcolare l'efficienza di legame ( $87.12 \pm 4.55$  %).

**Tabella 5.** Valutazione del cy-RGDC legato alle microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub> reticolate chimicamente

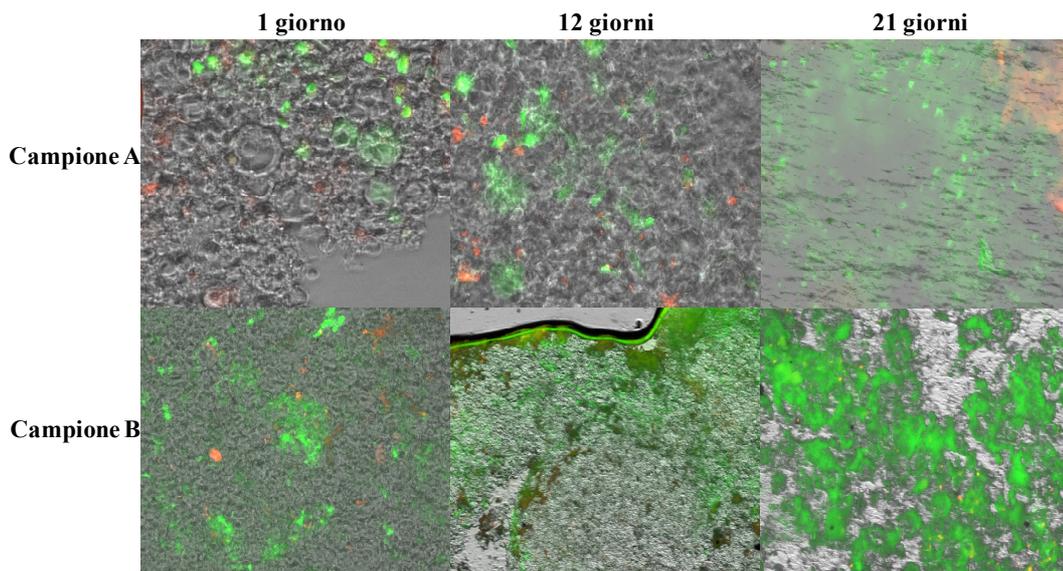
Campione	mmol cy-RGDC aggiunte	mmol cy-RGDC legate	% efficienza di legame
1 mg microparticelle di HA-EDA-C <sub>18</sub> -MLB <b>lotto B</b>	$1.62 \times 10^{-4}$	$1.42 \times 10^{-4} \pm 6.20 \times 10^{-6}$	$87.12 \pm 4.55$

L'elevata efficienza di funzionalizzazione ottenuta, suggerisce che l'aggiunta del cy-RGDC subito dopo l'inizio del processo di reticolazione tra i due lotti di microparticelle, non compromette l'elevata selettività di reazione.

### 3.5.3 Formazione degli aggregati BM-hMSC/microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub> reticolate chimicamente

La procedura di reticolazione chimica è stata ripetuta in presenza di cellule staminali mesenchimali del midollo osseo umano (BM-hMSC). In particolare, le BM-hMSC sono state aggiunte alle microparticelle funzionalizzate con il 2-imminotiolano e alle microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub> non funzionalizzate. Successivamente le prime sono state miscelate con le microparticelle **lotto B** ottenendo il campione reticolato e siglato **campione B**, le seconde sono state miscelate con le microparticelle **lotto A** ottenendo il campione non reticolato e siglato **campione A**. Dopo mezz'ora ad entrambi i campioni è stato aggiunto il cy-RGDC e sono stati incubati. I campioni sono stati coltivati per 10 giorni con il mezzo di coltura condrostimolante.

A giorni di coltura stabiliti è stato effettuato il saggio *LIVE&DEAD* su entrambi i campioni (**Fig. 42**).



**Figura 42.** Saggio di vitalità cellulare *LIVE&DEAD* sui **campioni A e B**

Considerando che non sono state evidenziate sostanziali differenze qualitative tra cellule vive (colorate in verdi) e cellule morte (colorate in rosso) tra il **campione A** (microparticelle non reticolate) ed il **campione B** (microparticelle reticolate), il risultato ha suggerito che il processo di reticolazione chimica non è dannoso per la vitalità cellulare.

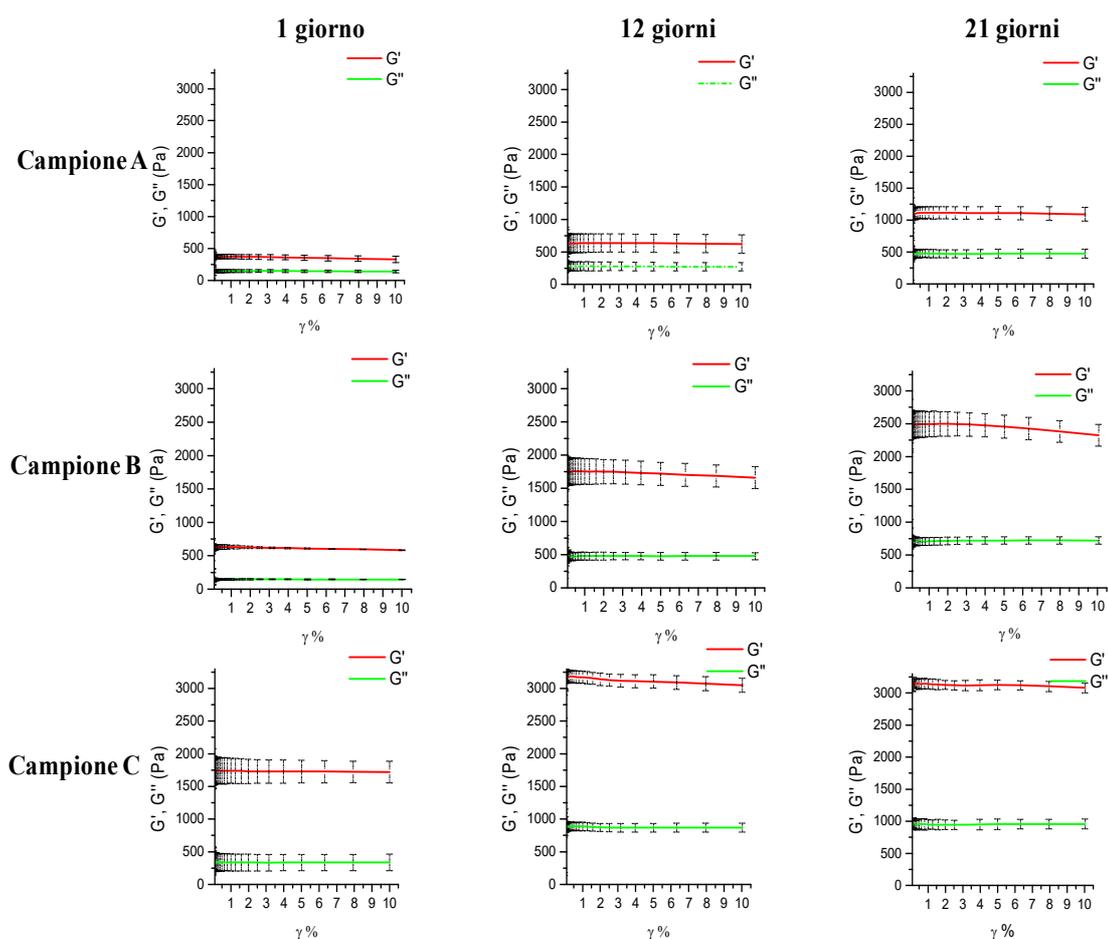
È probabile che il maggior numero di cellule morte visualizzate dopo un giorno di coltura possa essere dovuto allo stress meccanico al quale le cellule sono sottoposte durante la fase di agitazione per il *crosslinking*.

In definitiva, il processo di reticolazione chimica non sembra avere effetti negativi sulla vitalità cellulare, in accordo con la nota citocompatibilità dell'aggiunta di *Michael* tra un tiolo ed una porzione  $\alpha,\beta$  insatura.

### 3.5.4 Studio reologico sugli aggregati BM-hMSC/microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub>

Dopo 1, 12 e 21 giorni di coltura, sono stati sottoposti ad analisi reologica gli aggregati indicati come: **campione A** (microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub> non reticolate coltivate con BM-hMSC), **campione B** (microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub> reticolate coltivate con BM-hMSC) e **campione C** (microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub> reticolate ed incubate senza cellule).

Il primo dato evidenziato dall'analisi reologica è stato la conferma che tutti i campioni hanno mostrato un comportamento simile ad un *hydrogel*, in quanto la componente  $G'$  (*storage modulus*) è sempre maggiore della componente  $G''$  (*loss modulus*) (**Fig. 43**).



**Figura 43.** Analisi reologica sui **campioni A, B e C** a tempi diversi

Per quanto riguarda il **campione A**, si nota che il modulo  $G'$  aumenta con il passare dei giorni, da 400 (1 giorno) fino a 1000 Pa (21 giorni) circa, indicando che, anche in assenza di reticolazione chimica, la sola interazione adesiva tra cellule e microparticelle (favorita dal cy-RGDC), consente di rafforzare le proprietà meccaniche dell'aggregato.

Per i campioni reticolati chimicamente invece, i valori misurati dei moduli  $G'$  e  $G''$  nell'arco di tempo considerato (1-21 giorni) sono stati più elevati rispetto al **campione A**. Il valore di  $G'$  del **campione B** è passato da 650 a

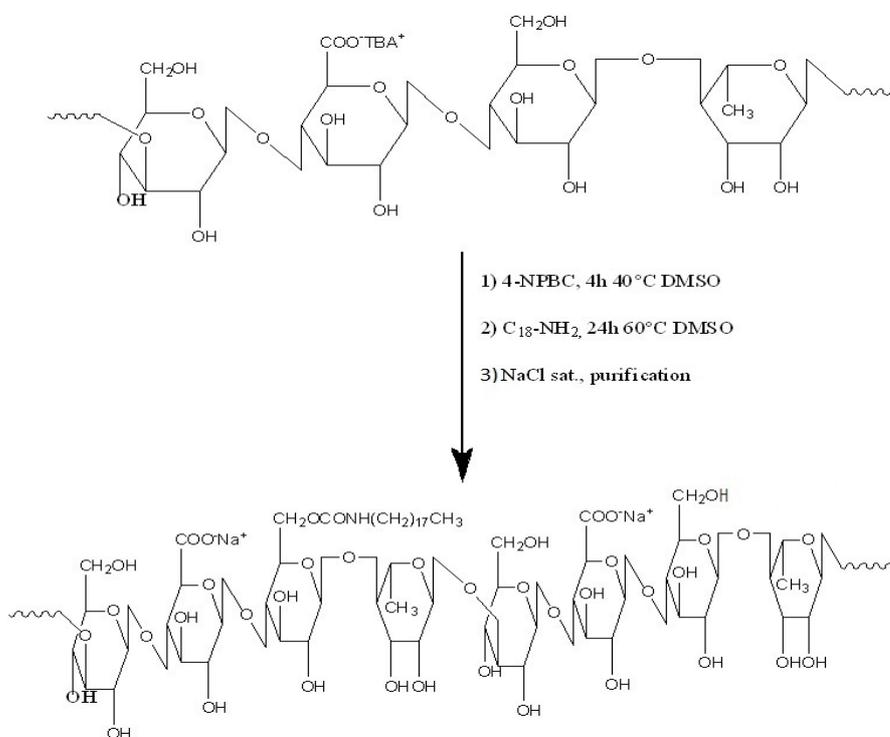
2500 Pa circa, per il **campione C** da 1750 a 3200 Pa circa. In particolare, l'incremento di  $G'$  nel caso del **campione C** si osserva durante i primi 12 giorni di analisi, per poi mantenersi costante tra 12 e 21 giorni. Questo aumento progressivo del modulo  $G'$  dei campioni **B** e **C** suggerisce che il processo di reticolazione chimica non si è fermato rapidamente dopo le prime ore dalla miscelazione delle microparticelle, ma è continuato lentamente nei giorni successivi. È chiaro pertanto come il processo di reticolazione chimica ha aumentato notevolmente la compattezza dei campioni e che la presenza di cellule ha influito sulle proprietà meccaniche, diminuendo l'efficienza della procedura di *crosslinking* (vedi risultati del **campione B**, **fig. 43**). Questa diminuzione è probabilmente da attribuire ad un effetto di ingombro sterico esercitato dalle cellule staminali che limitano il contatto microparticella-microparticella. I dati analizzati suggeriscono quindi come la reticolazione chimica possa potenziare la *performance* meccanica dei sistemi BM-hMSC-microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub>.

### **3.6 Preparazione e caratterizzazione di *hydrogel* di nuovi derivati del gellan gum**

#### **3.6.1 Derivatizzazione del gellan gum con ottadecilammina**

La reazione di funzionalizzazione del gellan gum (GG) con ottadecilammina (C<sub>18</sub>-NH<sub>2</sub>) è stata condotta in DMSO secondo lo **schema 6**, utilizzando 2

differenti quantità di C<sub>18</sub>-NH<sub>2</sub> in modo da ottenere due derivati indicati come GG-C<sub>18</sub> (1) e GG-C<sub>18</sub> (2).



**Schema 5.** Schema di sintesi dei derivati GG-C<sub>18</sub>

I valori del peso molecolare medio ponderale (*Molecular weight*, Mw) e dell'indice di polidispersità (PDI), ottenuti tramite analisi GPC, per il GG, il GG-C<sub>18</sub> (1) e il GG-C<sub>18</sub> (2) sono riportati in **tabella 6**.

**Tabella 6.** Peso molecolare medio ponderale (Mw) e indice di polidispersità (PDI) per il GG di partenza, il GG-C<sub>18</sub> (1) e il GG-C<sub>18</sub> (2)

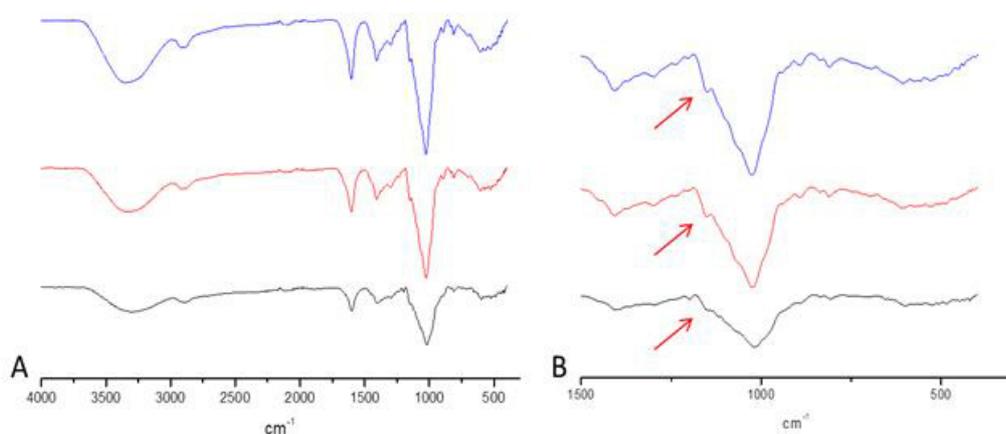
Campione	Mw (Da)	PDI
GG	1080856	2.19
GG-C <sub>18</sub> (1)	1071456	2.21
GG-C <sub>18</sub> (2)	1061368	2.27

Non è stato possibile determinare il grado di funzionalizzazione dei due derivati GG-C<sub>18</sub> tramite analisi <sup>1</sup>H-NMR a causa dello slargamento dei principali segnali della catena polimerica, tipico per i polimeri con un peso molecolare superiore a 80000 g/mol [Pelletier S. et al., 2000; Vårum K.M. et al., 1991] ed anche perché il segnale dei gruppi metilenici dell'ottadecilammina ( $\delta$  1.5 ppm) legati al GG, si trova nella stessa regione del segnale del metile del ramnosio ( $\delta$  1.45 ppm).

Il legame chimico (legame uretanico) tra l'ottadecilammina e il GG è stato confermato tramite analisi ATR-FTIR. È noto infatti che lo spettro FT-IR del gruppo uretanico è caratterizzato da bande ammidiche I (*stretching* del gruppo C=O) a  $\sim 1705$  cm<sup>-1</sup>, da una banda ammidica II (combinazioni fuori fase delle vibrazioni dei gruppi OCN e NH) a  $\sim 1531$  cm<sup>-1</sup>, dall'accoppiamento delle vibrazioni dello *stretching* C-N e C-O a  $\sim 1174$  cm<sup>-1</sup> e dalla vibrazione dello *stretching* simmetrico C-O-C a  $\sim 1064 - \sim 1017$  cm<sup>-1</sup> [Dias R.C.M. et al., 2010; Vlad S. et al., 2009].

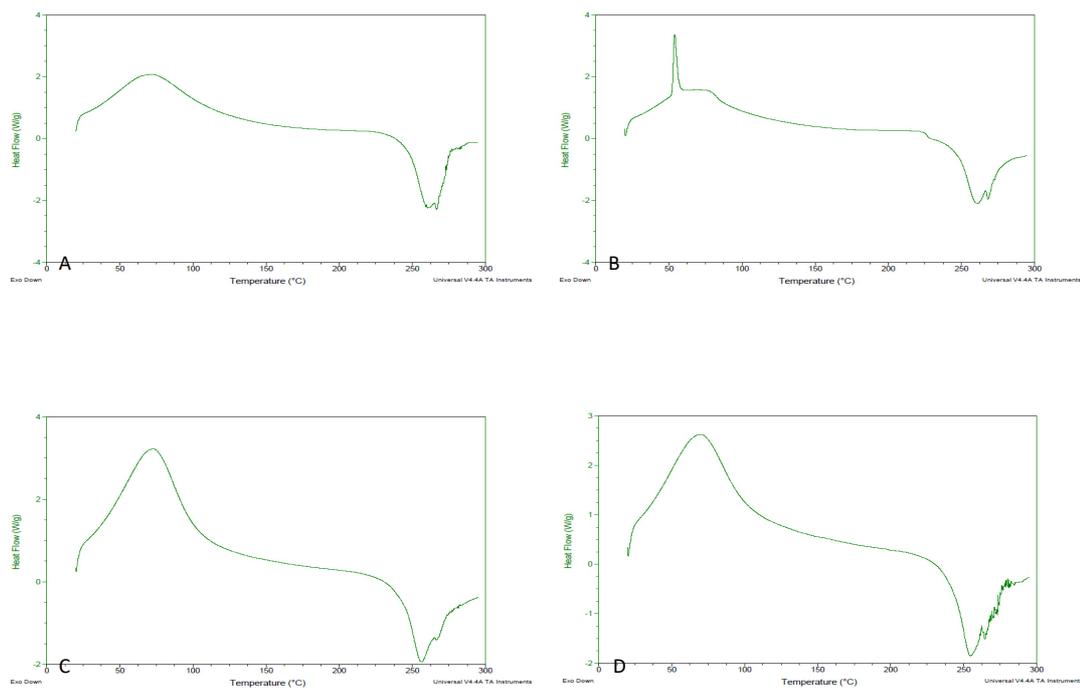
Nello spettro ATR-FTIR del GG di partenza (**Fig. 44**), è stato osservato un picco debole a  $\sim 1160$  cm<sup>-1</sup> (dovuto allo *stretching* del legame C-O-C degli

anelli a 6 termini degli zuccheri che formano il GG); questo picco è più intenso nello spettro ATR-FTIR dei derivati GG-C<sub>18</sub> (1) e (2) in quanto il segnale dello *stretching* del legame C-O-C degli zuccheri si somma al segnale dell'accoppiamento delle vibrazioni dello *stretching* C-N e C-O del gruppo uretanico dovuto alla funzionalizzazione con l'ottadecilammina (Fig. 44).



**Figura 44.** **A)** Spettri ATR- FTIR del GG di partenza (spettro nero), del GG-C<sub>18</sub> (1) (spettro rosso) e del GG-C<sub>18</sub> (2) (spettro blu) nel range 4000-500 cm<sup>-1</sup>; **B)** spettri ATR- FTIR del GG di partenza (spettro nero), del GG-C<sub>18</sub> (1) (spettro rosso) e del GG-C<sub>18</sub> (2) (spettro blu) nella regione compresa tra 1500 e 500 cm<sup>-1</sup>

L'avvenuta funzionalizzazione chimica è stata confermata anche dall'analisi DSC condotta sui campioni di GG, GG-C<sub>18</sub> (1), GG-C<sub>18</sub> (2) e sulla miscela fisica del GG con C<sub>18</sub>-NH<sub>2</sub> (Fig. 45).



**Figura 45.** Termogrammi DSC dei campioni **A)** GG; **B)** GG + C<sub>18</sub>-NH<sub>2</sub>; **C)** GG-C<sub>18</sub> (2); **D)** GG-C<sub>18</sub> (1)

Tutti i termogrammi mostrano un picco endotermico intorno ai 70 °C, dovuto alla perdita dell'umidità assorbita dal campione, tipicamente osservata nel GG.

Nelle curve DSC del GG e della miscela fisica (GG + C<sub>18</sub>-NH<sub>2</sub>) è stato registrato un picco a 261 °C (**Fig. 45A e 45B**, rispettivamente). Questo picco esotermico è probabilmente dovuto alla degradazione del polimero con formazione di acqua, monossido di carbonio e metano [Zohuriaan M.J. e Shokrolahi F., 2004]. Inoltre, nella curva DSC della miscela fisica, sono stati osservati un picco endotermico a 54 °C e una “spalla” esotermica intorno a 227 °C dovuti alla presenza di ottadecilammina libera (**Fig. 45B**).

Nei termogrammi dei derivati GG-C<sub>18</sub> (2) e GG-C<sub>18</sub> (1), il picco a 261 °C tipico del GG è lievemente spostato a temperature più basse, 256 °C e

254 °C rispettivamente, inoltre ha assunto una forma diversa (**Fig. 45C** e **45D**). Questo *shift* verso temperature più basse e il cambio di forma del picco esotermico, osservato nelle curve DSC del GG-C<sub>18</sub> (2) e del GG-C<sub>18</sub> (1), potrebbe essere dovuto alla riduzione della natura idrofila del materiale [Broderick E. et al., 2006], inoltre l'assenza dei picchi dovuti all'ottadecilammina suggerisce che non è presente C<sub>18</sub>-NH<sub>2</sub> libera nei derivati GG-C<sub>18</sub> (2) e GG-C<sub>18</sub> (1).

### 3.6.2 Analisi termo-reologica

Entrambi i derivati GG-C<sub>18</sub> (1) e GG-C<sub>18</sub> (2) sono solubili in acqua deionizzata a 37°C, a differenza del GG di partenza (**Fig. 46A**).



**Figura 46.** **A)** Soluzione acquosa di GG-C<sub>18</sub> (2) (sinistra) e dispersione acquosa del GG (destra) entrambi al 2% p/v dopo un giorno a 37 °C sotto costante agitazione; **B)** gocce della soluzione acquosa di GG-C<sub>18</sub> (2) a temperatura ambiente; **C)** *hydrogel* di GG-C<sub>18</sub> (2) ottenuto in PBS 1x

Per la solubilizzazione del GG in acqua deionizzata, è necessaria un'elevata temperatura (90°C per 20-30 minuti), invece i derivati GG-C<sub>18</sub> (1) e (2) sono

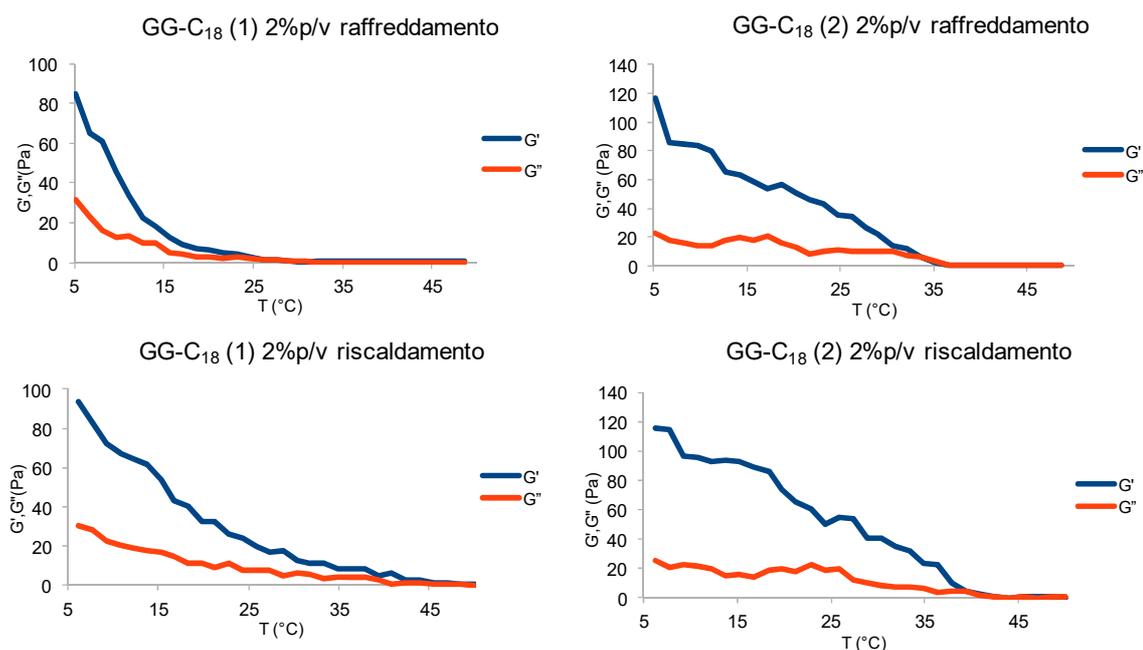
solubili a 37 °C, probabilmente la presenza delle catene di C<sub>18</sub> influenza la conformazione dei polimeri (**Fig. 46A e B**).

Il GG è in grado di formare *hydrogel* fisici per un abbassamento della temperatura o grazie alla presenza di cationi mono e divalenti, anche se i cationi divalenti permettono una gelificazione più efficace rispetto a quelli monovalenti [Singh B.N. e Kim K.H., 2005]. Anche i derivati GG-C<sub>18</sub> (1) e (2) si sono mostrati in grado di formare *hydrogel* in presenza di cationi (**Fig. 46C**).

Per studiare il comportamento visco-elastico dei derivati GG-C<sub>18</sub> (1) e (2), è stata eseguita un'analisi termo-reologica in una rampa di temperatura.

Per ciascun campione (GG, GG-C<sub>18</sub> (1) e (2)), i valori dello *storage modulus* G' e quello del *loss modulus* G'' si sono mostrati bassi prima del punto di *crossover* e dopo questo punto, il valore di G' è aumentato, assumendo valori più elevati di quelli del G''. Inoltre, per ciascun campione, il valore di G' è aumentato drasticamente al diminuire della temperatura.

La **figura 47** mostra il comportamento reologico degli *hydrogel* acquosi dei derivati GG-C<sub>18</sub> (1) e (2) al 2% p/v.



**Fig. 47.** Dipendenza dalla temperatura dello *storage modulus*  $G'$  e del *loss modulus*  $G''$  durante il processo di raffreddamento e riscaldamento per le soluzioni acquose del GG-C<sub>18</sub> (1) e (2) al 2% p/v

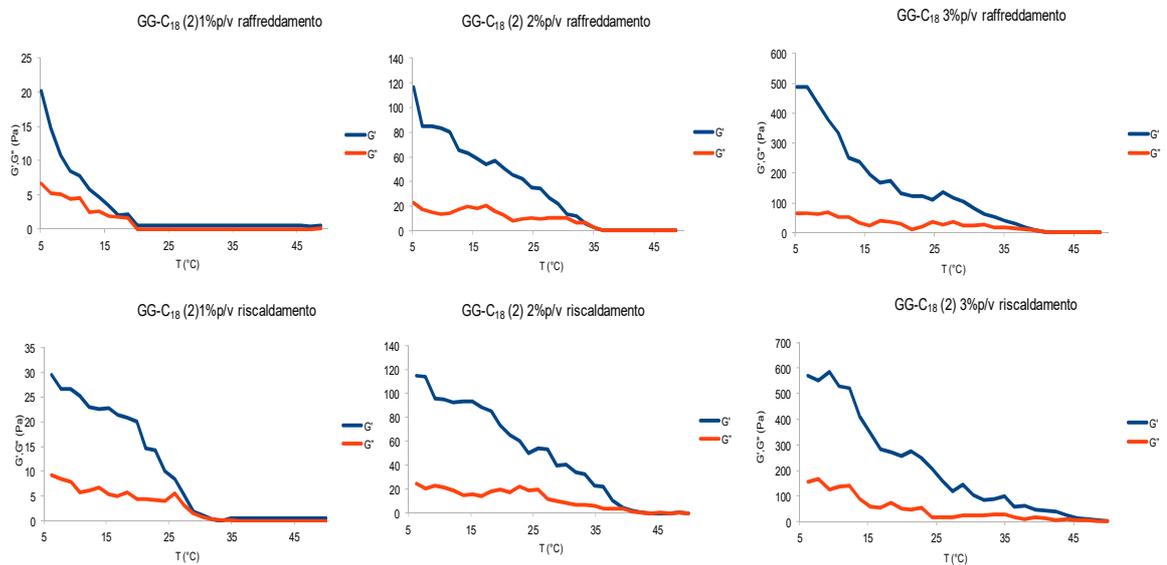
La tipica soluzione visco-elastica è stata trasformata in un *hydrogel* intorno a 35°C e 26°C per il GG-C<sub>18</sub> (2) e GG-C<sub>18</sub> (1), rispettivamente (**Fig. 47**). Nel processo di riscaldamento, il punto di *crossover* delle soluzioni dei derivati GG-C<sub>18</sub> (2) e (1) si sposta a temperature più elevate per l'effetto *aging* degli *hydrogel*.

I valori dei moduli  $G'$  e  $G''$  dei derivati GG-C<sub>18</sub> (1) e (2) sono risultati molto più bassi dei valori dei moduli  $G'$  e  $G''$  del GG al 2% p/v calcolati nelle stesse condizioni, i derivati ottenuti quindi hanno formato *hydrogel* più deboli di quelli del GG di partenza col diminuire della temperatura. Questo risultato può essere dovuto sia all'effetto sterico delle catene di C<sub>18</sub>-NH<sub>2</sub> che non ha permesso un'aggregazione forte delle catene di GG, sia all'effetto

idrofobico sempre della catena alchilica, che non ha permesso all'acqua di svolgere il suo classico effetto plasticizzante.

Il derivato GG-C<sub>18</sub> (2) ha mostrato un punto di *crossover* vicino alla temperatura fisiologica, per questa ragione è stato scelto per ulteriori analisi.

La **figura 48** mostra il comportamento reologico delle soluzioni acquose di GG-C<sub>18</sub> (2) a differenti concentrazioni, ovvero 1, 2 e 3% p/v.



**Figura 48.** Dipendenza dalla temperatura dei moduli  $G'$  e  $G''$  durante il processo di raffreddamento e riscaldamento per soluzioni acquose di GG-C<sub>18</sub> (2) all'1, 2 e 3% p/v

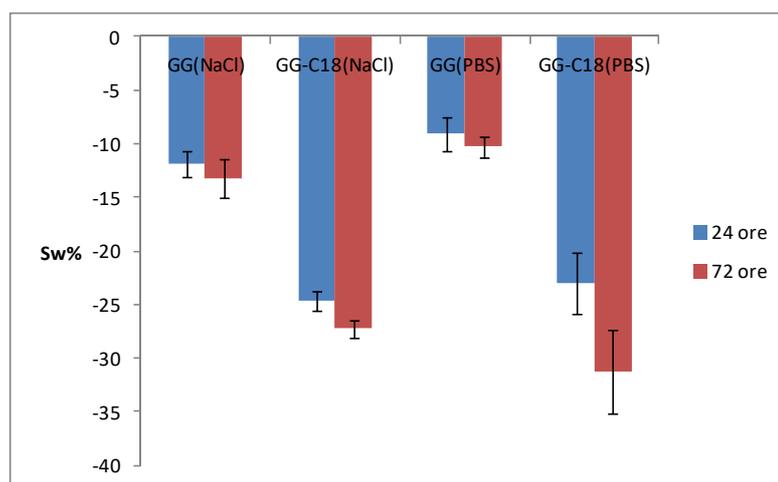
All'aumentare della concentrazione polimerica, le catene del polimero sono più vicine, ciò facilita l'associazione intermolecolare con la conseguente formazione di un *network* più compatto. Nel processo di riscaldamento, per tutte le concentrazioni studiate, il punto di *crossover* si è spostato a temperature più alte per l'effetto *aging* degli *hydrogel* formati (**Fig. 48**).

### 3.6.3 Caratterizzazione degli *hydrogel*

#### 3.6.3.1 Studi di *swelling*

Gli *hydrogel* di GG-C<sub>18</sub> (2) e GG sono stati immersi in NaCl 0.9% p/v e in PBS pH 7.4 per 24 e 72 ore.

Tutti gli *hydrogel*, quando immersi in queste soluzioni, si sono immediatamente contratti con una conseguente diminuzione della loro massa (**Fig. 49**).



**Figura 49.** Percentuale di *swelling* (Sw%) nel tempo (24 e 72 ore) per gli *hydrogel* di GG e di GG-C<sub>18</sub> (2) in NaCl (0.9% p/v) e in PBS pH 7.4 a 37 °C

Gli *hydrogel* di GG-C<sub>18</sub> (2) hanno mostrato una contrazione maggiore e statisticamente significativa ( $p < 0.05$ ) sia in NaCl 0.9 % p/v che in PBS pH 7.4, rispetto agli *hydrogel* di GG, dopo 24 e 72 ore. È stato inoltre osservato un significativo ( $p < 0.05$ ) aumento nei valori di *deswelling*, tra 24 e 72 ore per gli *hydrogel* di GG-C<sub>18</sub> (2) sia in NaCl 0.9% p/v che in PBS

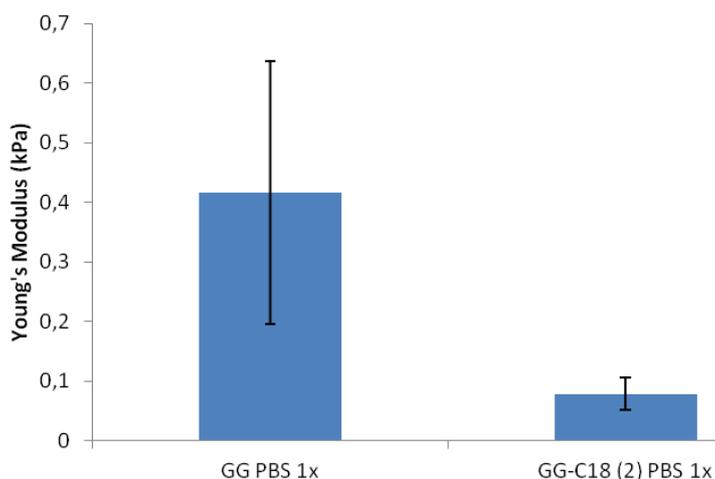
pH 7.4, invece per quelli di GG, la percentuale di *deswelling* si è mantenuta costante nel tempo in entrambi i mezzi studiati.

Si può supporre che le catene alchiliche nel GG-C<sub>18</sub> (2) respingono le molecole di acqua fuori dall'*hydrogel* mostrando quindi valori di *deswelling* più elevati. Lo stesso comportamento è stato riportato da Qiang Li e collaboratori in *hydrogel* di polifosfoesteri all'aumentare del contenuto di acrilato [Li Q. et al., 2006] e da Daniela F. Coutinho e collaboratori per il gellan gum metacrilato [Coutinho D.F. et al., 2010].

### **3.6.3.2 Studio delle proprietà meccaniche degli *hydrogel***

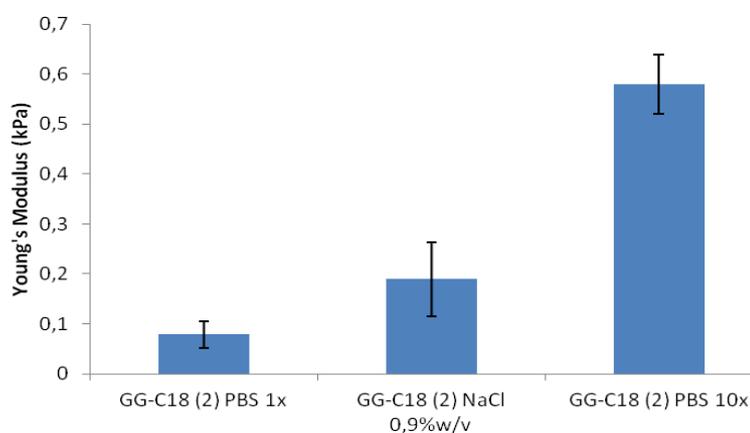
Lo *stiffness* dei materiali impiantati dovrebbe essere in accordo con quello dei tessuti da sostituire [Mauro N. et al., 2016; Ghosh K., et al., 2007; Engler A.J., et al., 2004].

Il modulo di Young degli *hydrogel* di GG-C<sub>18</sub> (2) è influenzato dalla presenza delle catene alchiliche e in presenza di cationi, il derivato GG-C<sub>18</sub> (2) ha formato degli *hydrogel* più deboli di quelli del GG di partenza ( $p < 0.05$ ) (**Fig. 50**).



**Figura 50.** Modulo di Young per gli *hydrogel* di GG e GG-C<sub>18</sub> (2) ottenuti in PBS 1x da una soluzione acquosa al 2% p/v

È stato osservato un aumento del valore del modulo di Young all'aumentare della concentrazione dei cationi nella soluzione in cui sono formati gli *hydrogel* di GG-C<sub>18</sub> (2). Non è stata invece notata una differenza statisticamente significativa tra gli *hydrogel* ottenuti in PBS 1x e quelli ottenuti in NaCl 0.9% p/v in accordo agli studi di *swelling* (**Fig. 51**).



**Figura 51.** Modulo di Young degli *hydrogel* di GG-C<sub>18</sub> (2) ottenuti a partire da una soluzione acquosa al 2% p/v in mezzi differenti: PBS 1x, NaCl 0.9% p/v, PBS 10x

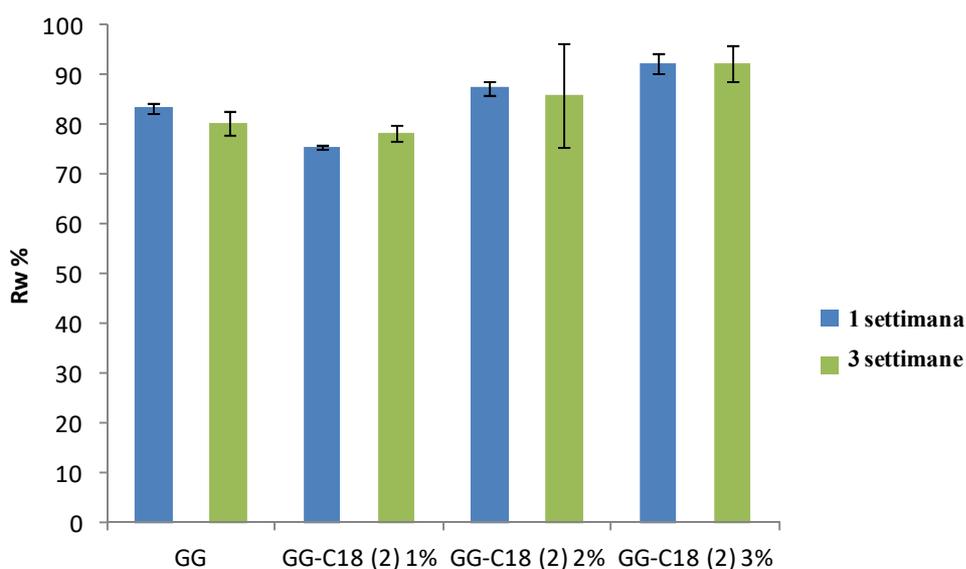
Il GG-C<sub>18</sub> (2) ha mantenuto quindi la capacità di rispondere alla concentrazione degli ioni in soluzione come il GG di partenza [Miyoshi E., et al., 1996].

### **3.6.3.3 Studi della stabilità degli *hydrogel***

Sono stati ottenuti *hydrogel* a partire da tre diverse concentrazioni (1, 2, 3% p/v) per il derivato GG-C<sub>18</sub> (2) per studiarne la stabilità in mezzi senza cationi divalenti a diversa temperatura.

Gli *hydrogel*, preparati in PBS 1x e rapidamente lavati per allontanare i sali di PBS, sono stati immersi in soluzione di NaCl 0.9% p/v per 1 e 3 settimane a 5 e 37 °C.

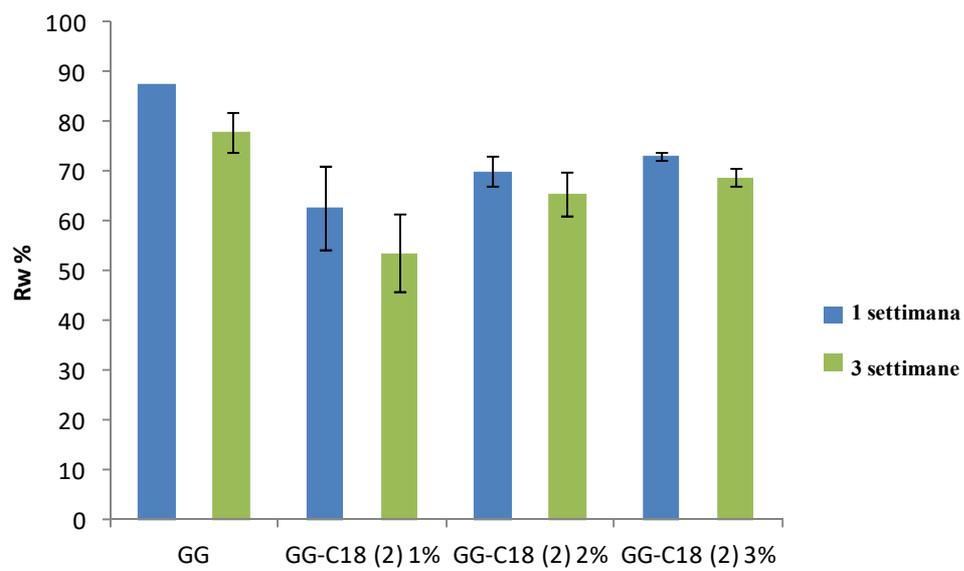
A 5°C, la massa degli *hydrogel* di GG-C<sub>18</sub> (2) recuperata dopo 1 settimana, è aumentata in maniera statisticamente significativa ( $p < 0.05$ ), all'aumentare della concentrazione della soluzione del polimero da cui sono formati (**Fig. 51**). È noto infatti che la concentrazione polimerica influenza il contenuto di eliche nelle soluzioni di GG e ciò permette un'aggregazione più intensa delle catene e quindi un *crosslinking* fisico più forte [Dai L., et al., 2008].



**Figura 51.** Percentuale della massa recuperata degli *hydrogel* di GG (2% p/v) e di GG-C<sub>18</sub> (2) (1, 2 e 3% p/v) dopo immersione in soluzione di NaCl 0.9% p/v per 1 e 3 settimane a 5°C

A 5°C, tutti gli *hydrogel* non hanno presentato una diminuzione della massa recuperata tra 1 e 3 settimane, e non è stata registrata una differenza statisticamente significativa tra gli *hydrogel* di GG e quelli di GG-C<sub>18</sub> (2) alla stessa concentrazione (2% p/v); in queste condizioni, tutti gli *hydrogel* sono risultati stabili.

A 37 °C la massa degli *hydrogel* di GG-C<sub>18</sub> (2) recuperata, per tutte le concentrazioni studiate, è stata più bassa rispetto a quella del GG dopo 1 settimana ( $p < 0.05$ ) ma tutti gli *hydrogel* di GG-C<sub>18</sub> (2) non hanno mostrato un aumento statisticamente significativo della perdita di massa tra 1 e 3 settimane (**Fig. 52**). Pertanto, gli *hydrogel* di GG-C<sub>18</sub> (2) sono risultati stabili anche a 37 °C.



**Figura 52.** Percentuale della massa recuperata degli *hydrogel* di GG (2% p/v) e di GG-C<sub>18</sub> (2) (1, 2 e 3% p/v) dopo immersione in soluzione di NaCl 0.9% p/v per 1 e 3 settimane a 37°C

## 4. Conclusioni

Nel presente lavoro di tesi di Dottorato di Ricerca, l'acido ialuronico (HA) e il gellan gum (GG), due polisaccaridi naturali, sono stati opportunamente funzionalizzati ottenendo nuovi derivati con i quali è stato possibile creare microambienti tridimensionali artificiali per potenziali applicazioni in medicina rigenerativa.

In particolare, è stato sintetizzato un derivato anfifilico dell'HA siglato HA-EDA-C<sub>18</sub> contenente porzioni alifatiche di ottadecilammina (C<sub>18</sub>) e porzioni etilendiamminiche (EDA).

Il polimero così ottenuto è risultato molto processabile, infatti sono state prodotte, utilizzando diverse tecniche, spugne porose, microfibre e microparticelle con determinate proprietà biologiche istruttive.

In particolare, le spugne porose di HA-EDA-C<sub>18</sub> sono state ottenute tramite la tecnica del *salt leaching* che ha permesso di controllare la dimensione dei pori. Queste spugne, caratterizzate tramite studi di *swelling*, di idrolisi chimica ed enzimatica, hanno mostrato un'elevata stabilità in mezzi fisiologici.

Le spugne di HA-EDA-C<sub>18</sub>, sono state funzionalizzate tramite la chimica della maleimmide, con cy-RGDC per aumentarne le proprietà bioadesive, inoltre sono state caricate con desametasone, scelto come effetto stimolante dei condrociti che sono stati coltivati nelle spugne. Gli studi

istologici hanno mostrato una maggiore produzione di collagene di tipo II nelle spugne caricate con desametasone e funzionalizzate con cy-RGDC, dimostrando quindi il loro effetto biologico sinergico.

La sensibilità alla forza ionica dell'HA-EDA-C<sub>18</sub> è stata sfruttata anche per produrre microfibre fisiche stabili senza l'uso di reticolanti chimici, tramite la tecnica della microfluidica. La dispersione polimerica di HA-EDA-C<sub>18</sub> è stata processata con un opportuno chip immerso in soluzioni di PBS a differenti concentrazioni. La morfologia e la stabilità delle microfibre ottenute è stata studiata tramite analisi al microscopio ottico e al SEM. Con la stessa tecnica, sono state prodotte microfibre caricate con il desametasone e sono stati studiati i profili di rilascio in PBS pH 7.4 dalle fibre formate in mezzi a concentrazione salina differente. I risultati ottenuti hanno mostrato che è stato possibile ottenere microfibre di HA-EDA-C<sub>18</sub> con dimensioni controllate tramite tecnica della microfluidica in condizioni biocompatibili (temperatura ambiente, assenza di *crosslinker* chimici). Inoltre è stato possibile modulare il profilo di rilascio del farmaco incapsulato cambiando solamente la forza ionica del mezzo in cui sono prodotte le microfibre di HA-EDA-C<sub>18</sub>. Tali microfibre potrebbero essere caricate con un ampio *range* di molecole bioattive ed essere usate sia come *drug delivery system* sia nel campo dell'ingegneria tissutale per esempio per la potenziale rigenerazione di vasi sanguigni.

È stato anche dimostrato che l'HA-EDA-C<sub>18</sub> può essere processato come un biomateriale micrometrico capace di stimolare la produzione di collagene di tipo II da parte di cellule staminali mesenchimali.

La sensibilità alla forza ionica dell'HA-EDA-C<sub>18</sub> ha permesso di ottenere, tramite la tecnica dello *spray drying*, microparticelle stabili in mezzo fisiologico, senza necessità di usare reticolanti chimici. I *coil* idrofobici del polimero, sono stati sfruttati anche per produrre microparticelle cariche con desametasone per controllarne il rilascio. Le porzioni etilendiamminiche invece, sono state impiegate per introdurre gruppi maleimmidici che hanno consentito di controllare la funzionalizzazione delle microparticelle con cy-RGDC e TGF-β<sub>3</sub>. L'introduzione del cy-RGDC ha permesso la formazione di aggregati tra le cellule staminali umane di midollo osseo (BM-hMSC) e le microparticelle già durante le prime ore di contatto, superando così uno dei maggiori svantaggi dell'HA quale la scarsa adesività cellulare. È stata dimostrata quindi l'avvenuta aggregazione *bottom up* tra le BM-hMSC e le microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub> con la conseguente formazione di uno *scaffold* 3D.

Inoltre, come dimostrato da studi di immunostochimica, le microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub> derivatizzate con cy-RGDC o con cy-RGDC e TGF-β<sub>3</sub>, hanno stimolato le cellule BM-hMSC a produrre collagene di tipo II anche se coltivate in un mezzo di coltura non differenziante. È stato pertanto dimostrato il potenziale effetto di stimolazione condrogenica delle

microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub> opportunamente derivatizzate. Questa strategia di funzionalizzazione potrebbe essere potenzialmente estesa ad altri biopolimeri per controllare la crescita e il differenziamento di cellule staminali.

È stata dimostrata inoltre, la possibilità di sfruttare la versatilità chimica delle microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub>, ottenute tramite tecnica dello *spray drying*, per derivatizzarle in maniera opportuna in modo da poterle reticolare chimicamente. Tali microparticelle reticolate sono state coltivate insieme alle BM-hMSC in mezzo condro-stimolante. È stato dimostrato come la rigidità del sistema, anche in assenza di reticolazione chimica, aumenti progressivamente nell'arco di tempo considerato per questa analisi (sia lo *storage modulus* che il *loss modulus* aumentano). Il contributo della reticolazione chimica si è rivelato essere fondamentale, in quanto migliora notevolmente lo *stiffening* dei campioni nelle prime ore dopo la miscelazione e tale effetto continua fino a circa metà dell'analisi.

Lo studio sulla vitalità cellulare ha evidenziato come il processo di reticolazione delle microparticelle sia biocompatibile, lasciando le cellule staminali libere di proliferare. Per aumentare l'adesione cellulare, i sistemi microparticellari sono stati funzionalizzati con cy-RGDC e il legame del peptide alle microparticelle è stato quantificato tramite tecniche HPLC.

Infine sono stati ottenuti dei derivati del gellan gum (GG), che sono risultati solubili in acqua deionizzata a temperature più basse rispetto al GG di

partenza. I derivati siglati come GG-C<sub>18</sub> (1) e (2), sono stati sintetizzati mediante reazione del GG con un'alchil ammina, previa appropriata attivazione dei gruppi ossidrilici primari del GG.

Il derivato GG-C<sub>18</sub> (2) ha mostrato un punto di *crossover* vicino alla temperatura fisiologica. È stato possibile ottenere *hydrogel* di GG-C<sub>18</sub> (2) versando semplicemente la soluzione polimerica in mezzi a forza ionica fisiologica.

In generale, sono state necessarie condizioni di *crosslinking* fisiologicamente compatibili (PBS 1x o NaCl 0.9% p/v) per produrre *hydrogel* a partire dai nuovi derivati del GG che potrebbero avere potenziali applicazioni in ambito biomedico, come ad esempio per l'incapsulazione cellulare.

## 5. Parte sperimentale

### 5.1 Materiali

L'acido ialuronico (HA) a basso peso molecolare (PM 240 kDa, indice di polidispersità 1.9) e l'HA come sale di tetrabuttilammonio (HA-TBA) sono stati prodotti come riportato precedentemente [Palumbo F.S. et al., 2006], partendo dal sodio ialuronato EP Altergon (grado iniettabile ultrapuro) di origine biofermentativa ad elevato peso molecolare (1058 kDa, con una viscosità intrinseca a 25 °C compresa tra 1.60 e 2.00 m<sup>3</sup>/kg) acquistato alla IBSA Farmaceutici Italia s.r.l.

L'ottadecilammina (C<sub>18</sub>-NH<sub>2</sub>), l'idrossido di tetrabuttilammonio (TBA-OH), la ialuronidasi testicolare bovina (1040 U/mg) (HAasi), il bis(4-nitrofenil) carbonato (4-NPBC), la soluzione 5% p/v di acido picrossolfonico (acido 2,4,6-trinitrobenzensolfonico TNBS), l'esametildisilazano, la N-idrossisuccinimide (NHS), il desametasone (Dex), il tampone fosfato Dulbecco (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* DPBS), il dietil etere, il cloroformio, il diclorometano, il dimetilsolfossido anidro (DMSO<sub>a</sub>), la collagenasi di tipo II estratta dal clostridium bovino, il *transforming growth factor*  $\beta$ 3 *active* (TGF- $\beta$ 3), il monoammino-monometossi-polietilenglicole, la N-(3-Dimetilamminopropil)-N'-etilcarbodiimmide idrocloruro (EDCI), il 2-imminotiolano idrocloruro e l'acido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) sono stati acquistati presso la Sigma-Aldrich (Italia). L'etilendiammina (EDA), il

tetraidrofurano (THF) e l'acido 4-maleimmidobutirrico (MLB) sono stati acquistati presso la Fluka (Italia). La N,N'-dicicloesilcarbodiimmide (DCC) è stata acquistata presso l'Alfa Aesar (Italia). Il 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carbossimetossifenil)-2-(4-sulfopenil)-2H-tetrazolio (MTS) (CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous One Solution Cell Proliferation) è stato acquistato presso la Promega (Italia). L'Arg-Gly-Asp-D-Phe-Cys-ciclico (cy-RGDC) è stato acquistato presso la Bachem (Svizzera). L'ossido di deuterio (D<sub>2</sub>O) è stato acquistato presso la Merck (Italia). Il tetraidrofurano deuterato (THF-d<sub>8</sub>) è stato acquistato presso la VWR (Italia). Il mezzo di coltura Dulbecco (*Dulbecco's modified eagle medium* DMEM) è stato acquistato presso l'Euroclone (Italia). Le cellule staminali umane di midollo osseo (StemPro<sup>®</sup> BM *human Mesenchymal Stem Cells*, BM-hMSC), il mezzo di coltura basale per le cellule staminali mesenchimali (StemPro<sup>®</sup> MSC SFM *Basal Medium*), il supplemento XenoFree (StemPro<sup>®</sup> MSC SFM *XenoFree Supplement*) e il kit di differenziamento condrogenico (StemPro<sup>®</sup> *Chondrogenesis Differentiation Kit*) sono stati acquistati presso la Life Technologies (Italia). Il kit per il saggio *LIVE&DEAD* è stato acquistato alla Thermo Fisher Scientific (Italia). Gli anticorpi CD 90 e CD 105 sono stati acquistati all'Abbiotec (USA), l'anticorpo per il collagene di tipo II è stato acquistato all'Acris (Germania). Il *Neutral buffered formalin* (NBF) è stato acquistato alla Bio-Optica (Italia). Il *Mayer's haematoxylin and eosin* (H&E) è stato acquistato alla Thermo Fisher

Scientific (USA). Il perossido d'idrogeno è stato acquistato alla Merck Millipore (Germania); l'*Universal Polymer Detection system* (Mach 1), il *Background sniper* e il *Betazoid DAB* sono stati acquistati alla Biocare Medical (USA). L'*Eukitt* è stato acquistato all'O. Kindler (Germania).

Il gellan gum (Gelrite<sup>®</sup>) (GG), il dimetilsolfossido ACS reagent (DMSO) e il tampone fosfato (PBS) sono stati acquistati alla Sigma-Aldrich (Portogallo), le soluzioni di PBS 1x, 5x e 10x sono state preparate seguendo le istruzioni del produttore. L'etilacetato è stato acquistato presso l'ENZYMATIC (Portogallo).

## 5.2 Metodi

Gli spettri <sup>1</sup>H-NMR sono stati realizzati con uno strumento Bruker AC-300. L'analisi di *Size-Exclusion Chromatography* (SEC) sull'HA è stata eseguita tramite un sistema Waters Multidetector provvisto di una pompa Waters 600, un Detector Waters 410 Refractive Index e una linear column della Waters (diametro delle particelle di 5 µm). La curva di taratura è stata determinata usando come standard l'HA acquistato dalla Hyalose (USA). Come eluente è stata usata una miscela 90:10 (v/v) di tampone fosfato 200 nM (pH 6.5) e metanolo con un flusso di 0.6 ml/min a 35°C.

Le misure UV sono state effettuate utilizzando uno spettrofotometro Shimadzu UV-2401PC.

Le analisi al microscopio a scansione (*Scanning Electron Microscope*, SEM) e quelle *Energy Dispersive X-ray Analysis* (EDAX) sono state eseguite su campioni ottenuti tramite la tecnica del “*freeze fracturing*”, rivestiti con oro e utilizzando il microscopio elettronico a scansione Philips XL30 ESEM.

Le analisi di *Fourier Transform-Infrared Spectroscopy* (FT-IR) e le analisi *Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared spectroscopy* (ATR-FTIR) sono state eseguite mediante lo strumento Bruker Alpha.

Le analisi al microscopio ottico e a fluorescenza sui film e sulle microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub> sono state eseguite mediante il microscopio Care Zeiss AXIO.

Le microfibre di HA-EDA-C<sub>18</sub> sono state prodotte tramite un'Elveflow<sup>®</sup> Microfluidic machine, utilizzando un *quartz droplet junction microfluidic chip* con ciascun canale di 190 µm (Dolomite microfluidics).

Le microfibre sono state analizzate tramite microscopio ottico TR500, VWR e tramite analisi SEM eseguite su campioni immersi in N<sub>2</sub> liquido e *freeze-drying*, rivestiti con oro e utilizzando il microscopio elettronico a scansione Auriga compact, Zeiss.

Le microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub> sono state prodotte utilizzando un Nano Spray Dryer B-90 BÜCHI.

Le analisi si *X-ray Photoelectron Spectroscopy* (XPS) sono state condotte usando lo strumento PHI 5000 VersaProbe II (ULVAC-PHI, Inc) con una sorgente Al K $\alpha$ , 1486.6 eV; 200 µm, 50 W.

Le analisi *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC) sono state eseguite tramite uno strumento Agilent Technologies 1260 con colonna Phenomenex C6-phenyl.

Le analisi reologiche sui campioni microparticellari sono state eseguite tramite il reometro DHR-2 TA Instruments Trios.

Le analisi di *Gel Permeation Chromatography* (GPC) sul gellan gum e derivati, sono state eseguite tramite un Malvern Viscotek TDA 305 dotato di tre detector, un rifrattometro, un *right angle light scattering* e un viscosimetro su un set di quattro colonne: una pre-colonna Suprema 5mm 8 50 S/N 3111265, una colonna Suprema 30Å 5mm 8 300 S/N 3112751, una colonna Suprema 1000Å 5mm 8 300 S/N 3112851 PL e una colonna Aquagel-OH MIXED 8mm 7.5 300 S/N 8MAOHMIX-46-51, con un *detection* dell'indice di rifrazione (RI-Detector 8110, Bischoff). Il sistema è stato mantenuto a 30°C. È stata usata l'acqua milliQ come eluente ad una velocità di flusso di 1 ml/min. Il tempo di eluizione e il segnale dell'indice di rifrazione sono stati calibrati con un set commerciale di polisaccaridi della Varian contenenti 10 standard di Pullulano con un ristretto indice di polidispersità e un *molecular mass at peak maximum* (Mp) da 180 Da a 708 kDa.

Le analisi termo-reologiche sul GG e sui suoi derivati sono state eseguite con un Malvern Kinexus Rotational Rheometer.

Le analisi di *Differential Scanning Calorimetry* (DSC) sono state eseguite

con un TA instrument DSC Q100 model.

Gli studi di compressione sono stati eseguiti tramite un Instron 5543 universal testing machine con una cella di carico di 1 kN.

### **5.3 Sintesi del polimero HA-EDA-C<sub>18</sub>**

1 g di HA-TBA è stato solubilizzato in 88 ml di DMSO anidro (DMSO<sub>a</sub>), usando un pallone da 250 ml posto in un bagno ad acqua a 40°C ed è stato attivato aggiungendo, sotto agitazione, 340.72 mg di 4-NPBC precedentemente solubilizzati in 8 ml di DMSO<sub>a</sub> in modo da soddisfare un rapporto teorico tra moli di 4-NPBC e moli di unità ripetitive di HA-TBA pari a 0.7; la reazione di attivazione è stata condotta per 4 ore a 40°C. Dopo questo tempo, la temperatura del bagno ad acqua è stata portata a 70°C e alla soluzione sono stati aggiunti, sotto agitazione, 150.92 mg di ottadecilammina precedentemente solubilizzati in 4 ml di DMSO<sub>a</sub>, in modo da soddisfare un rapporto teorico tra moli di ottadecilammina e moli di 4-NPBC, pari a 0.5. Il pallone di reazione è stato dunque posizionato in uno “StarFish multiexperiment work station” a 60°C e la fase di funzionalizzazione è proseguita per 24 ore. Successivamente il pallone di reazione è stato nuovamente collocato in un bagno ad acqua alla temperatura di 40°C e sono stati aggiunti 752 µl di etilendiammina (EDA) per ottenere un rapporto teorico tra moli di EDA e moli di 4-NPBC pari a 10; la reazione è stata condotta per 3 ore.

Il *work-up* della reazione ha previsto l'aggiunta di 1 ml di soluzione satura di cloruro di sodio (1 ml per grammo di HA-TBA) sotto agitazione per 30 minuti, allo scopo di scambiare lo ione tetrabuttilammonio (TBA) con lo ione sodio. Successivamente è stata effettuata la precipitazione del prodotto di reazione in una miscela dietil etere/cloroformio 1:1 v/v. Sono stati eseguiti 6 lavaggi a caldo nella stessa miscela e successivamente 3 lavaggi in miscela etanolo/acqua 8:2 v/v ed infine in etanolo assoluto. Il prodotto è stato quindi essiccato.

La sintesi è stata eseguita in triplicato e il grado di funzionalizzazione in C<sub>18</sub>-NH<sub>2</sub> ed EDA è stato espresso come valore medio  $\pm$  deviazione standard. I derivati HA-EDA-C<sub>18</sub> ottenuti sono stati caratterizzati tramite analisi <sup>1</sup>H-NMR. Un tipico spettro <sup>1</sup>H-NMR in D<sub>2</sub>O/THF<sub>d</sub><sub>8</sub> 2:1 mostra segnali a:  $\delta$  0.99 (-CH<sub>3</sub> dell'ottadecilamina);  $\delta$  1.5 (gruppi metilenici della catena dell'ottadecilamina -CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>-CH<sub>3</sub>);  $\delta$  1.9 (gruppo metilico della porzione N-acetilglucosammina dell'HA);  $\delta$  3.3-4.0 (gruppi piranosidici dell'unità disaccaridica dell'HA). Il grado di funzionalizzazione in ottadecilamina è stato calcolato come rapporto tra l'integrale dei picchi a  $\delta$  0.99 e  $\delta$  1.5, rispettivamente dei -CH<sub>3</sub> e -CH<sub>2</sub> dell'ottadecilamina, e l'integrale del picco a  $\delta$  1.9 del -CH<sub>3</sub> dell' N-acetilglucosammina. Il grado di funzionalizzazione in EDA del polimero è stato calcolato tramite il saggio colorimetrico TNBS [Fields R., 1972] usando come standard il monoammino-monometossi-polietilenglicole (PM 2000Da).

## **5.4 Spugne porose di HA-EDA-C<sub>18</sub>**

### **5.4.1 Produzione di spugne porose di HA-EDA-C<sub>18</sub>**

L'HA-EDA-C<sub>18</sub> ottenuto come polvere, è stato solubilizzato alla concentrazione dell'8% p/v in una miscela di H<sub>2</sub>O/THF 2:1 v/v a 60°C per 24 ore. Diverse siringhe in plastica, dal volume di 1 ml e dal diametro di 5 mm, sono state riempite fino ad un volume di 600 µl, come segnato dalle tacche volumetriche delle stesse, con NaCl setacciato con una granulometria compresa tra 63 e 90 µm. Il sale è stato impaccato nelle siringhe esercitando una pressione tramite lo stantuffo. La soluzione di HA-EDA-C<sub>18</sub> dopo solubilizzazione è stata caricata nella siringa e forzata attraverso l'intero volume di NaCl. Dopo 24 ore dal caricamento delle siringhe, le stesse sono state recise all'estremità inferiore e quindi, sono state tagliate porzioni da 100 µl (in base alla gradazione volumetrica della siringa) costituite dal polimero e dal sale e poste in DPBS pH 7.4, effettuando diversi lavaggi. Le spugne ottenute sono state infine lavate con acqua bidistillata e liofilizzate.

### **5.4.2 Caratterizzazione delle spugne di HA-EDA-C<sub>18</sub>**

La porosità delle spugne di HA-EDA-C<sub>18</sub> è stata misurata tramite un picnometro a gas, usando l'elio come agente penetrante. Il picnometro a gas misura il volume reale di un campione poroso escludendo il volume dei pori. Spugne cilindriche di HA-EDA-C<sub>18</sub> sono state usate per valutare il volume in *bulk*. Conoscendo il volume in *bulk* ( $V_b$ ) e quello ottenuto tramite il

picnometro ( $V_p$ ), è possibile ottenere la porosità ( $\varepsilon$ ) delle spugne tramite la seguente formula  $\varepsilon = (V_b - V_p)/V_b \times 100$  [Ho S.T. e Hutmacher D.W., 2006].

Gli *scaffold* prodotti sono stati rivestiti con oro per essere analizzati tramite microscopio elettronico a scansione e sono state acquisite immagini delle sezioni trasversali di ciascuno di essi.

Sono stati inoltre studiati lo *swelling* dinamico e l'idrolisi chimica delle spugne di HA-EDA-C<sub>18</sub> in DPBS pH 7.4 fino a 42 giorni. In particolare per gli studi di *swelling*, le spugne sono state prima pesate, sterilizzate tramite raggi UV per un'ora usando una lampada da 125 W (per evitare inquinamento batterico), quindi incubati con 2 ml di DPBS pH 7.4 sterile a 37°C. Dopo 1, 7, 14 e 42 giorni, le spugne rigonfiate sono state pesate rimuovendo il mezzo liquido in eccesso. Lo *swelling* è stato espresso come rapporto in peso tra la spugna rigonfia e quella secca (q).

Sulle spugne è stata determinata anche la perdita di massa, espressa come percentuale di riduzione della massa iniziale. Dopo aver calcolato lo *swelling* infatti, ogni campione è stato lavato in una miscela EtOH/H<sub>2</sub>O 9:1 v/v e successivamente liofilizzato e pesato.

Le frazioni di HA solubili rilasciate dalle spugne sono state determinate tramite saggio al carbazolo [Bitter T. e Muir H.M., 1962]. I risultati sono stati espressi come percentuale di acido uronico rilasciata rispetto al controllo ottenuto effettuando il saggio su spugne di HA-EDA-C<sub>18</sub> immerse

in acqua distillata fino a completa dissoluzione. Infatti, le spugne sono materiali sensibili alla forza ionica, stabili in tamponi salini come il DPBS pH 7.4 ma solubili in acqua [Palumbo F.S. et al., 2015a].

Per gli studi di idrolisi enzimatica, le spugne di HA-EDA-C<sub>18</sub> sono state pesate ed immerse in 2 ml di DPBS pH 7.4 contenenti 30 o 60 U/ml di HAasi fino a 48 ore. A tempi stabiliti, sono state determinate le quantità delle frazioni solubili di HA (dissolte o idrolizzate dalle spugne) tramite saggio al carbazolo. I risultati sono stati espressi come percentuale di acido uronico rilasciata rispetto al controllo ottenuto dissolvendo le spugne di HA-EDA-C<sub>18</sub> in acqua. Le spugne inoltre, sono state lavate in una miscela EtOH/H<sub>2</sub>O 9:1 v/v, liofilizzate e pesate; il valore ottenuto rappresenta la massa della spugna dopo l'idrolisi enzimatica. La perdita in massa è stata espressa come riduzione percentuale rispetto alla massa iniziale (perdita in massa percentuale).

#### **5.4.3 Sintesi del derivato MLB-NHS**

50 mg di acido 4-maleimmidobutirrico (MLB) sono stati solubilizzati sotto agitazione in 2 ml di diclorometano, usando un pallone da 5 ml. In seguito sono stati aggiunti 33.4 mg di N-idrossisuccinimide (NHS) in modo da soddisfare il rapporto teorico tra le moli di NHS e quelle di MLB pari a 1.1. La funzione carbossilica dell'MLB è stata attivata aggiungendo 59.8 mg di N,N'-dicicloesilcarbodiimmide (DCC), in modo da rispettare il rapporto

teorico tra le moli di DCC e quelle di MLB pari a 1:1. La reazione è stata condotta a temperatura ambiente, sotto agitazione *over-night*. Al termine, la soluzione è stata filtrata mediante filtro di carta per eliminare la dicitocloesilurea (DCU) precipitata, successivamente è stata concentrata al rotavapor, quindi posta in frigo per 30 minuti. La soluzione è stata nuovamente filtrata e il filtrato è stato seccato tramite rotavapor. Al residuo secco sono stati aggiunti etilacetato e dietil etere in rapporto volumetrico 1:1 ed il prodotto cristallizzato è stato recuperato per centrifugazione. La procedura è stata ripetuta più volte sul surnatante sino al completo recupero del prodotto. L'intera reazione è stata monitorata tramite cromatografia su strato sottile (*Thin Layer Chromatography* TLC) con una lastra fluorurata su cui sono stati caricati NHS, MLB e il prodotto di reazione, usando come eluente una miscela EtOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 2:1. La corsa cromatografica è stata valutata tramite lettura con lampada UV.

#### **5.4.4. Valutazione qualitativa del *grafting* di MLB-NHS e di cy-RGDC su un film bidimensionale di HA-EDA-C<sub>18</sub>**

L'HA-EDA-C<sub>18</sub> è stato solubilizzato al 3% p/v in H<sub>2</sub>O/THF 2:1 v/v a 60°C per 24 ore. 100 µl di questa soluzione sono stati posti in una cuvette in quarzo in modo tale da rivestire una delle due pareti laterali trasparenti all'UV e lasciati in *orbital shaker* a 37 °C per 24 ore. Dopo l'evaporazione della miscela e la formazione di un film polimerico sottile di HA-EDA-C<sub>18</sub>,

è stato aggiunto 1 ml soluzione di MLB-NHS (2.18 mg) in DPBS pH 7.4/DMSO 16:1 v/v (rapporto teorico tra moli di MLB-NHS e moli dei gruppi EDA nell'HA-EDA-C<sub>18</sub> pari a 4). La reazione è stata condotta a temperatura ambiente per 7 ore. Quindi, il film è stato lavato diverse volte in DPBS pH 7.4 per eliminare il derivato MLB-NHS che non ha reagito, successivamente la cuvette è stata riempita con 1 ml di DPBS a pH 7.4. Il film polimerico immerso nel tampone fosfato è stato dunque sottoposto ad analisi UV per valutare la comparsa di una “spalla” a 300 nm relativa alla funzionalizzazione dell'HA-EDA-C<sub>18</sub> con il gruppo maleimmidico.

Successivamente si è proceduto con la reazione con il cy-RGDC. In particolare, 1 ml di una soluzione di cy-RGDC in DPBS pH 7.4 è stato aggiunto al film di HA-EDA-C<sub>18</sub> per ottenere un rapporto teorico tra moli di cy-RGDC e moli di gruppi EDA nell'HA-EDA-C<sub>18</sub> pari a 1.2. La reazione tra cy-RGDC e l'HA-EDA-C<sub>18</sub> è stata seguita valutando la scomparsa della “spalla” a 300 nm sempre tramite analisi UV.

#### **5.4.5 Studi di adesione cellulare condotti su film di HA-EDA-C<sub>18</sub>-cyRGDC**

I condrociti utilizzati negli esperimenti sono stati isolati dalla cartilagine bovina. In particolare, la cartilagine articolare è stata recisa dall'articolazione del metacarpo del piede bovino ottenuto da un mattatoio locale ed usata entro 12 ore dalla recisione. La cartilagine è stata

dissezionata, ridotta in piccoli pezzi con un bisturi e trattata per 10 minuti con una soluzione fredda di etanolo (70% v/v in DPBS pH 7.4 sterile).

I pezzi sono stati lavati diverse volte con DPBS pH 7.4 sterile e incubati a 37°C per 1 ora con una soluzione contenente 20 U/ml di Dispase (Sigma-Aldrich, Italia) in DMEM addizionato con 10% v/v di siero bovino fetale (FBS), 1% v/v di soluzione di penicillina/streptomina, 1% di glutammina e 0.1% di soluzione di amfotericina B. Successivamente, sono stati incubati per altre 18 ore con una soluzione di collagenasi di tipo I (64 U/ml) (derivata dal *clostridium histolyticum*) (Sigma-Aldrich, Italia) in DMEM completo.

Dopo la digestione enzimatica, il mezzo è stato filtrato attraverso un filtro sterile di 120 µm, i condrociti sono stati raccolti mediante centrifugazione (1500 rpm per 5 minuti), sospesi in DMEM completo fresco e piastrati in fiasche di coltura T-75. I condrociti isolati sono stati usati tra il passaggio 1 e 4.

Quattro pozzetti di una camera *cover-glass cell culture* (Nunc, Roskilde, Danimarca) sono stati rivestiti con aliquote di 50 µl di HA-EDA-C<sub>18</sub> al 3% (p/v) in miscela di H<sub>2</sub>O/THF 2:1. Dopo la formazione dei film polimerici, due di questi pozzetti sono stati trattati in successione (come mostrato nel paragrafo 5.4.4) con la soluzione di MLB-NHS in DPBS pH 7.4 sterile e DMSO (16:1) (1.1 mg/0.5 ml) per 7 ore. Dopo lavaggio con DPBS pH 7.4 sterile, i pozzetti sono stati trattati con la soluzione di cy-RGDC in DPBS

pH 7.4 sterile (1mg/1ml) per un'ora. I film sono stati successivamente sterilizzati con raggi UV con una lampada di 125 W per 30 minuti.

Una sospensione di condrociti bovini colorata con *Cell Tracker Green* CMFDA (5-clorometil-fluoresceina diacetato) (Thermo) in DMEM (10000 cellule in 100  $\mu$ l) è stata seminata in ogni singolo pozzetto, per un totale di sei pozzetti: due rivestiti con HA-EDA-C<sub>18</sub>-cyRGDC, due contenenti solo HA-EDA-C<sub>18</sub> e due pozzetti contenenti il solo mezzo di coltura utilizzati come controllo positivo. L'adesione cellulare è stata valutata tramite microscopio a fluorescenza fino a 48 ore.

#### **5.4.6 *Grafting* del derivato MLB-NHS e del cy-RGDC sulle spugne di HA-EDA-C<sub>18</sub>**

La funzionalizzazione delle spugne porose di HA-EDA-C<sub>18</sub> con cy-RGDC è stata eseguita seguendo la procedura utilizzata per funzionalizzare i film (paragrafo 5.4.4). In particolare le spugne porose sono state trattate con una soluzione di MLB-NHS solubilizzato in una miscela DPBS pH 7.4/DMSO 16:1 v/v per soddisfare un rapporto teorico tra moli di MLB-NHS e moli di gruppi EDA nell'HA-EDA-C<sub>18</sub> pari a 4. La quantità di MLB legata a ciascuna spugna è stata valutata indirettamente, determinando la quantità di MLB-NHS consumata nel mezzo di reazione tramite analisi UV e la funzionalizzazione è stata espressa come rapporto in peso (p/p) tra MLB legato e massa di spugna di HA-EDA-C<sub>18</sub>. In particolare, dopo 7, 24 e 48 ore

di reazione, le spugne sono state lavate in DPBS pH 7.4, tutte le acque di lavaggio sono state raccolte e aggiunte al mezzo di reazione e la quantità totale di MLB-NHS non reagito è stata calcolata valutando l'intensità del picco a 260 nm.

Le spugne funzionalizzate con MLB, dopo lavaggio in DPBS pH 7.4, sono state incubate con una soluzione di cy-RGDC in DPBS pH 7.4 (1 ml) ad una concentrazione tale da soddisfare un rapporto teorico finale tra moli di cy-RGDC e moli di gruppi EDA dell'HA-EDA-C<sub>18</sub> pari a 1.2. La reazione è stata condotta a temperatura ambiente per 1 ora. L'avvenuta funzionalizzazione con il cy-RGDC è stata valutata tramite analisi FT-IR valutando la scomparsa del picco maleimmidico (-HC = CH- stretching) a 1707 cm<sup>-1</sup> [Ramesh S. et al., 2012] e tramite lo studio dell'abbondanza % dello zolfo tramite microscopia EDAX eseguita su più sezioni delle spugne, in maniera tale da valutare l'uniformità di funzionalizzazione.

#### **5.4.7 Caricamento del desametasone nelle spugne di HA-EDA-C<sub>18</sub> e HA-EDA-C<sub>18</sub>-cyRGDC e studi di rilascio**

Le spugne di HA-EDA-C<sub>18</sub> e HA-EDA-C<sub>18</sub>-cyRGDC (3 mg) sono state impregnate con 100 µl di una soluzione di desametasone (Dex) in acetone a due concentrazioni, ovvero 0.15 e 0.30 mg/ml. L'acetone è stato fatto evaporare ponendo le spugne sotto vuoto per 24 ore. Successivamente, per determinare la *drug loading*, ciascuna spugna è stata pesata, dissolta in 1 ml

di H<sub>2</sub>O/THF 2:1 v/v, dopo di che è stato aggiunto 1 ml di THF allo scopo di precipitare il polimero ed estrarre il desametasone incorporato. La quantità di Dex in ogni spugna è stata determinata tramite analisi UV a 238 nm utilizzando un'opportuna curva di calibrazione.

Gli studi di rilascio invece, sono stati eseguiti ponendo ciascuna spugna caricata con diverse quantità di Dex, in 1 ml di DPBS pH 7.4. I campioni sono stati incubati in *orbital shaker* a 37 °C. A tempi stabiliti, tutto il volume è stato prelevato e sostituito con DPBS pH 7.4 fresco e la quantità di desametasone, nel mezzo prelevato, è stata determinata spettrofotometricamente a 241 nm tramite una curva di calibrazione. Il profilo di rilascio del Dex dagli *scaffold* di HA-EDA-C<sub>18</sub> e HA-EDA-C<sub>18</sub>-cyRGDC è stato paragonato al profilo di rilascio di uno *scaffold* di HA-EDA *cross-linkato* chimicamente, caricato con Dex all'1% p/v. In particolare l'HA-EDA con un grado di funzionalizzazione del 30 mol % in EDA [Palumbo F.S. et al., 2012] è stato solubilizzato in acqua (8% p/v), successivamente sono stati aggiunti EDCI e NHS (rapporto tra moli di EDCI (o NHS) e moli di gruppi EDA nell'HA-EDA pari a 1) e la risultante miscela di reazione è stata caricata in una siringa riempita con NaCl avente un *range* dimensionale compreso tra 63 e 90 µm. Dopo l'avvenuto *crosslinking* chimico, sono state tagliate porzioni contenenti polimero reticolato e sale, dal volume di 0.1 ml (come segnato dalla gradazione della siringa) e immersi in acqua per far avvenire il *salt leaching*.

Dopo lavaggio e liofilizzazione, le spugne sono state caricate con Dex e sono stati eseguiti gli studi di rilascio come precedentemente descritto.

#### **5.4.8 Coltivazione in vitro di condrociti bovini su spugne di HA-EDA-C<sub>18</sub> e HA-EDA-C<sub>18</sub>-cyRGDC**

Spugne di HA-EDA-C<sub>18</sub> e HA-EDA-C<sub>18</sub>-cyRGDC caricate e non con Dex sono state poste su una piastra da 96 pozzetti e sterilizzati tramite radiazioni UV con una lampada da 125 W per un'ora [Fiorica C., et al., 2013]. Successivamente, 0.2 ml di una sospensione cellulare ( $2.5 \times 10^6$  cellule/ml) sono stati seminati su ciascuna spugna. La vitalità dei condrociti nelle spugne è stata determinata dopo 1, 12 e 24 giorni tramite saggio MTS, seguendo le istruzioni del produttore. I dati di vitalità sono stati riportati come densità ottica assoluta misurata a 420 nm.

È stata eseguita anche un'analisi SEM per osservare i condrociti dopo 12 e 24 giorni di coltura in ciascuno *scaffold*. In particolare, per ciascun tempo, i campioni sono stati lavati con DPBS sterile pH 7.4 e fissati con formalina al 4% v/v a 4°C per 5 ore, poi sono stati sciacquati velocemente in acqua e deidratati trattando le spugne con una serie di soluzioni etanoliche (30%, 50%, 70%, 90% ed etanolo puro). Infine sono state trattate con esametildisilazano, seccate sotto cappa a flusso laminare ed analizzate tramite SEM [Braet F. et al., 1997].

#### **5.4.9 Studi di istologia e immunoistochimica sulle spugne di HA-EDA-C<sub>18</sub> e HA-EDA-C<sub>18</sub>-cyRGDC**

Dopo 12 e 24 giorni, i condrociti coltivati nelle spugne di HA-EDA-C<sub>18</sub> e HA-EDA-C<sub>18</sub>-cyRGDC con e senza Dex, sono stati fissati con formalina al 10% v/v. Successivamente le spugne con i condrociti fissati sono state incorporate nella paraffina, quindi sezionate (4 µm) per le analisi istologiche e di immunoistochimica.

Le sezioni sono state deparaffinizzate, reidratate tramite soluzioni etanoliche e colorate con H&E.

La produzione di collagene di tipo II è stata valutata tramite immunoistochimica. In particolare, dopo deparaffinizzazione, le sezioni sono state scaldate in una soluzione di citrato di sodio (pH 6.0) a 96°C per 20 minuti. L'attività della perossidasi endogena è stata bloccata con perossido di idrogeno al 3% p/v in metanolo per 30 minuti. Le sezioni sono state poi trattate con *Background Sniper* per 15 minuti e incubati per 1 ora a temperatura ambiente con l'anticorpo monoclonale di topo IgG anti collagene di tipo II (1:100). Dopo 2 lavaggi con tampone fosfato (PBS), le sezioni tissutali sono state incubate per 15 minuti con dei *probe*, e per 30 minuti con perossidasi di rafano a temperatura ambiente, in accordo con le istruzioni del produttore. Come substrato della perossidasi è stata usata la 3,3-diamminobenzidina (DAB) e dalla conseguente reazione (5 minuti), è stato ottenuto un precipitato marrone. Le sezioni sono state trattate con

ematossilina, deidratate, lavate e trattate con *Eukitt*. L'anticorpo primario specifico è stato sostituito con PBS in sezioni di tessuto utilizzati come controlli negativi. Tutte le sezioni colorate sono state analizzate con un ingrandimento 200x con un microscopio Leica DMR collegato ad una camera digitale Nikon DS-Fil.

## **5.5 Microfibre di HA-EDA-C<sub>18</sub>**

### **5.5.1 Tecnica di produzione delle microfibre di HA-EDA-C<sub>18</sub>**

Le microfibre di HA-EDA-C<sub>18</sub> sono state ottenute tramite la tecnica della microfluidica utilizzando un chip di quarzo *droplet junction* con canali da 190 µm (Dolomite microfluidics,UK).

Una quantità pesata di HA-EDA-C<sub>18</sub> è stata solubilizzata in un *vial* al 4% p/v in un volume adeguato di miscela H<sub>2</sub>O/EtOH 1:1 v/v; il *vial* è stato lasciato *over-nigth* in *orbital shaker*. La dispersione colloidale di HA-EDA-C<sub>18</sub> è stata posta in un eppendorf e connessa al chip con tubi di PTFE. Il chip è stato immerso in soluzioni di PBS (scelto come mezzo di coagulazione) a diverse concentrazioni, 1x, 5x e 10x. Quando la dispersione colloidale polimerica è stata spinta fuori dal chip, l'HA-EDA-C<sub>18</sub> ha coacervato formando microfibre fisiche stabili. Le microfibre sono state lasciate nelle rispettive soluzioni di PBS per due ore per permettere la completa coacervazione del polimero e rimuovere l'EtOH.

### **5.5.2 Caratterizzazione e studio qualitativo della stabilità delle microfibre di HA-EDA-C<sub>18</sub>**

Le microfibre di HA-EDA-C<sub>18</sub> ottenute come descritto nel paragrafo precedente, sono state tagliate; alcuni pezzi sono stati analizzati tramite microscopio ottico, altri pezzi invece sono stati immersi in azoto liquido e *freeze-dried*, quindi analizzati tramite SEM.

Inoltre le microfibre di HA-EDA-C<sub>18</sub> ottenute nei diversi mezzi sono state incubate in 3 ml di PBS pH 7.4 in *orbital shaker* a 37°C. Dopo una settimana, la morfologia superficiale delle stesse è stata analizzata tramite microscopio ottico e analisi SEM.

### **5.5.3 Studi di rilascio dalle microfibre di HA-EDA-C<sub>18</sub> caricate con desametasone**

La procedura descritta nel paragrafo 5.5.1, è stata usata per produrre microfibre di HA-EDA-C<sub>18</sub> con il desametasone incorporato. In particolare, dopo la dissoluzione del polimero, è stata aggiunta un'appropriata quantità di Dex (5% p/p rispetto alla massa del polimero), la dispersione è stata lasciata in *orbital shaker* a 37°C *over-night* per permettere la solubilizzazione del farmaco. Dopo la produzione, le microfibre sono state lasciate nei rispettivi mezzi per due ore.

Le fibre di HA-EDA-C<sub>18</sub> ottenute, caricate con Dex, sono state tagliate; alcuni pezzi sono stati pesati e trattati con una miscela THF/acqua distillata

3:1 v/v per estrarre il farmaco e calcolare la *drug loading*. La quantità di desametasone è stata determinata tramite un Synergy HT multi-detection microplate reader (Bio-Tek's Gen5™, USA), seguendo il picco a 241 nm. Altri pezzi pesati di microfibre caricate con Dex sono stati posti in 4 ml di PBS pH 7.4; i campioni sono stati incubati in *orbital shaker* a 37°C per studiare il profilo di rilascio del farmaco. Ad intervalli di tempo stabiliti, sono stati prelevati 300 µl di soluzione e sono stati sostituiti con la stessa quantità di PBS pH 7.4 fresco. La quantità di Dex è stata determinata spettrofotometricamente a 241 nm. Ciascun esperimento è stato condotto in triplicato.

## **5.6 Microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub>**

### **5.6.1 Produzione di microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub>**

Le microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub> sono state prodotte attraverso la tecnica dello *spray drying* tramite il Nano Spray Dryer B-90 (BÜCHI).

In particolare l' HA-EDA-C<sub>18</sub> è stato solubilizzato in una miscela H<sub>2</sub>O/EtOH 1:1 v/v a tre concentrazioni differenti, ovvero 0.5, 0.75 e 1% p/v rispettivamente. I *vial* sono stati posti in *orbital shaker* a 37 °C per 24 ore, successivamente le dispersioni colloidali ottenute sono state filtrate singolarmente tramite un filtro da 5 µm e spruzzate tramite lo *spray dryer* a tre differenti temperature, 90, 100 e 117°C ed usando una *spray cap* con pori di 7µm. È stata impostata una *spray rate* del 100% e come gas essiccante è

stata usata l'aria filtrata e deumidificata ad una *flow rate* di 110 l/min con una conseguente pressione interna di 34 mbar.

### **5.6.2 Caratterizzazione delle microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub>**

La morfologia delle microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub> ottenute nelle diverse condizioni, è stata studiata attraverso microscopio ottico e analisi SEM.

1 mg di ciascun campione di microparticelle è stato sospeso in 1 ml di DPBS pH 7.4 e sonicato per pochi minuti fino a completa dispersione, successivamente il campione è stato posto in *orbital shaker* per due ore ed è stato analizzato tramite microscopio ottico per determinare il diametro medio delle microparticelle.

Per gli studi di *swelling* invece, ciascun campione di microparticelle è stato disperso in DPBS pH 7.4 come precedentemente riportato e posto in *orbital shaker*. Dopo 24 e 48 ore, sempre tramite microscopio ottico, è stata analizzata la distribuzione dimensionale delle microparticelle, calcolata usando il Qwin Image Processor della Leica.

Le microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub> ottenute da una dispersione polimerica allo 0.75 % p/v con una temperatura interna nel Nano Spray Dryer di 117°C (da qui in avanti chiamate semplicemente **lotto A**) sono state ulteriormente caratterizzate attraverso studi di idrolisi chimica ed enzimatica. In particolare, campioni da 3 mg di microparticelle del **lotto A** sono stati dispersi in 1 ml di DPBS pH 7.4 in assenza o in presenza di 30 U/ml di

ialuronidasi (HAasi) e posti a 37 °C. A tempi predeterminati, la quantità delle frazioni di HA dissolte o idrolizzate dalle microparticelle, sia chimicamente che enzimaticamente, è stata determinata tramite saggio al carbazolo [Bitter T. e Miur H.M., 1962]. Per determinare la quantità totale di acido uronico nelle microparticelle, il saggio al carbazolo è stato eseguito anche su un'appropriata quantità di HA-EDA-C<sub>18</sub> solubilizzata in acqua alla concentrazione di 3 mg/ml.

### **5.6.3 Produzione di microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub> caricate con desametasone e studi di rilascio**

La procedura descritta nel paragrafo 5.6.1 è stata usata anche per produrre microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub> caricate con Dex. In particolare, l'HA-EDA-C<sub>18</sub> è stato solubilizzato in una miscela H<sub>2</sub>O/EtOH 1:1 v/v allo 0.75% p/v, successivamente è stata aggiunta un'adequata quantità di Dex (0.7 e 1% p/p rispetto alla massa del polimero) e la dispersione è stata lasciata *over-night* in *orbital shaker* a 37°C per permettere la solubilizzazione del farmaco prima di essere *spray dried* a 117°C.

Le microparticelle così ottenute sono state analizzate tramite SEM.

Il profilo di rilascio del Dex dalle microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub> è stato seguito per entrambi i lotti indicati rispettivamente come **Dex+(0.7%)** e **Dex+(1.0%)**.

In particolare, lotti da 3 mg di microparticelle **Dex+(0.7%)** e **Dex+(1.0%)**, sono stati sospesi in 0.3 ml di DPBS pH 7.4 e posti nell'inserto di una piastra da 24 pozzetti Nunc<sup>TM</sup>. In ciascun pozzetto sono stati aggiunti 1.2 ml di DPBS pH 7.4 e i campioni sono stati incubati a 37°C. Ad intervalli di tempo stabiliti, è stato prelevato 1 ml di DPBS pH 7.4 da ciascun pozzetto e rimpiazzato con un'aliquota fresca di tampone. La quantità di Dex è stata determinata spettrofotometricamente (UV) a 241 nm.

#### **5.6.4 Funzionalizzazione delle microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub> con cy-RGDC e con TGF-β3**

Le microparticelle (**lotto A**) sono state funzionalizzate con il cy-RGDC, tramite addizione di *Michael* sfruttando la chimica della maleimmide, già descritta per le spugne di HA-EDA-C<sub>18</sub> (vedi paragrafo 5.4.6).

In particolare, le microparticelle sono state funzionalizzate prima con l'estere N-idrossisuccinimmidico dell'acido 4-maleimmido butirrico, sintetizzato come riportato nel paragrafo 5.4.3, usando tre differenti rapporti in peso tra mg di MLB-NHS e mg di microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub>, ovvero 0.09, 0.18 e 0.27 rispettivamente.

In particolare, lotti da 5 mg di microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub> sono stati dispersi in 1.7 ml di una miscela DMSO/DPBS pH 7.4 1:16 v/v contenente l'opportuna quantità di MLB-NHS per soddisfare i vari rapporti in peso impostati, e fatti reagire per 7 ore a 37°C. Le microparticelle sono state

successivamente lavate in DPBS pH 7.4 e la quantità di MLB-NHS non reagita è stata valutata spettrofotometricamente (UV) a 260 nm. Dopo lavaggio, le microparticelle sono state fatte reagire, per 2 ore a 37 °C sotto agitazione, con l'opportuna quantità di cy-RGDC solubilizzato in 1 ml di DPBS pH 7.4 per soddisfare un rapporto teorico tra moli di cy-RGDC e moli di MLB-NHS pari a 1.1.

La funzionalizzazione con MLB è stata accertata qualitativamente tramite analisi ATR-FTIR. I tre campioni di microparticelle funzionalizzate con MLB-NHS con rapporti di funzionalizzazioni diversi, ovvero 0.09, 0.18 e 0.27 e successivamente funzionalizzati anche con cy-RGDC, sono stati rispettivamente indicati come **cyRGDC+(a)**, **cyRGDC+(b)**, **cyRGDC+(c)**. La quantità di cy-RGDC legata per mg di microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub> è stata calcolata indirettamente valutando la quantità di cy-RGDC non reagito tramite analisi HPLC [Zhongya C. et al., 2012]. In particolare, dopo le 2 ore di reazione con cy-RGDC, le microparticelle sono state centrifugate e lavate due volte con 1 ml di DPBS pH 7.4. Il surnatante e le aliquote del mezzo di lavaggio sono stati raccolti e analizzati tramite HPLC usando una colonna C6-Phenyl termostata a 30 °C, una miscela acetonitrile (con 0.1% v/v di acido trifluoroacetico)/acqua (con 0.1% v/v di acido trifluoroacetico) 20:80 come fase eluente con una velocità di flusso di 1 ml/min e la lettura UV è stata effettuata a 214 nm.

Le microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub> (**lotto A**) sono state funzionalizzate anche con il *transforming growth factor β3* (TGF-β3). In particolare, 150 μl di soluzione di TGF-β3 (0.02 μg/μl in acqua bidistillata) sono stati attivati usando 6 μl di una soluzione di 2-imminotiolano idrocloruro (0.145 M in DPBS pH 7.4) a 37°C per 1 ora sotto agitazione seguendo una procedura riportata in letteratura [Sridhar B.V. et al., 2014; He Q. et al., 2011]. Due lotti da 1 mg di microparticelle sono stati attivati prima con MLB-NHS (mg MLB-NHS/mg microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub> pari a 0.18), successivamente sono stati incubati rispettivamente con 10.2 e 20.4 μl di TGF-β3 pre-attivati (corrispondenti a 200 e 400 ng rispettivamente di TGF-β3) aggiungendo DPBS pH 7.4 fino a 100μl e fatti reagire per 1 ora a 37 °C sotto agitazione. Il TGF-β3 non reagito e rimasto nel surnatante è stato quantificato tramite il saggio ELISA.

Per la produzione delle microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub> funzionalizzate sia con cy-RGDC che con TGF-β3 è stata ripetuta la procedura precedentemente riportata per legare il TGF-β3 (400 ng di fattore di crescita) e dopo centrifugazione, le microparticelle sono state trattate anche con una soluzione di cy-RGDC per soddisfare un rapporto tra moli di cy-RGDC e moli di MLB-NHS pari a 1.1 (campione siglato come **TGFβ3+;cyRGDC+**). La quantità di cy-RGDC legata è stata valutata tramite analisi HPLC come precedentemente riportato.

### 5.6.5 Analisi XPS sulle microparticelle

Le microparticelle liofilizzate di HA-EDA-C<sub>18</sub> (2 mg), siglate come **lotto A**, **cyRGDC+(b)** e **TGFβ3+;cyRGDC+** sono state analizzate tramite XPS utilizzando lo strumento riportato nel paragrafo 5.2.

### 5.6.6 Studi di adesione e formazione degli aggregati BM-hMSC/microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub>

Un *crio-vial* di StemPro<sup>®</sup> BM-hMSC (1x10<sup>6</sup> cellule) è stato scongelato e sospeso nello StemPro<sup>®</sup> MSC SFM *Basal Medium* con l'aggiunta di StemPro<sup>®</sup> MSC SFM *XenoFree supplement*, glutammina e una soluzione di penicillina/streptomicina. Le cellule sono state piastrate in fiasche da coltura T-75 e sono state usate dopo un passaggio.

Le cellule sono state colorate con *Cell Tracker Green CMFDA* (5-clorometil-fluoresceina diacetato) (Thermo) immediatamente prima di essere coltivate con le microparticelle. Brevemente, le cellule sono state staccate dalla fiasca con una soluzione di tripsina e centrifugate fino ad ottenere un pellet. Il pellet è stato ri-sospeso con una soluzione 25 nM di *Cell Tracker* nel mezzo di coltura basale (senza additivi) ed incubato a 37 °C per 30 minuti. Le cellule sono state successivamente centrifugate e ri-sospese nel mezzo di coltura cellulare completo. Prima dell'esperimento le microparticelle **lotto A** sono state sterilizzate tramite radiazioni UV per 30 minuti con una lampada da 125 W [Fiorica C. et al., 2013].

Successivamente in condizioni di sterilità, le stesse microparticelle sono state funzionalizzate con cy-RGDC e TGF- $\beta$ 3 seguendo le condizioni precedentemente riportate per ottenere i lotti siglati: **cyRGDC+(a)**, **cyRGDC+(b)** e **TGF $\beta$ 3+;cyRGDC+**. Questi lotti sono stati impiegati per gli studi biologici.

In particolare, 2.5 ml di sospensione cellulare trattati con *Cell Tracker Green* ( $1 \times 10^5$  cellule/ml) in mezzo completo sono stati mescolati con 0.5 mg di microparticelle (rapporto numerico microparticelle/cellule 4:1) di ciascun lotto (**cyRGDC+(a)**, **cyRGDC+(b)** e **TGF $\beta$ 3+;cyRGDC+**). I campioni (microparticelle e cellule) sono stati mescolati leggermente tramite l'uso di un vortex e conservati in un incubatore rotazionale. Questa procedura è stata ripetuta ogni 15 minuti per 1 ora e 30 minuti ed infine i campioni sono stati lasciati nell'incubatore rotazionale. A tempi stabiliti (0, 1.5, 2.5 e 18 ore) i campioni sono stati osservati tramite microscopio a fluorescenza.

### **5.6.7 Coltura degli aggregati BM-hMSC/microparticelle HA-EDA-C<sub>18</sub>**

Le BM-hMSC coltivate sono state trattate con tripsina e contate, successivamente sono state sospese in mezzo di coltura completo. Le microparticelle **lotto A** e quelle **Dex+(1.0%)** sono state sterilizzate tramite radiazioni UV con una lampada da 125 W per 30 minuti. I lotti di microparticelle **cyRGDC+(b)** e **TGF $\beta$ 3+;cyRGDC+** sono stati prodotti in condizioni di sterilità partendo dal **lotto A** sterilizzato.

Per valutare il potenziale effetto condro-stimolante sulle BM-hMSC, sono stati usati insieme lotti diversi di microparticelle, ovvero microparticelle **cyRGDC+(b)** assieme al **lotto A** (70:30 p/p) e microparticelle **TGFβ3+;cyRGDC+** assieme al lotto **Dex+(1.0%)** (70:30 p/p).

In particolare, le BM-hMSC ( $5 \times 10^4$  cellule/ml) sono state coltivate con le due combinazioni di microparticelle (**cyRGDC+(b)/lotto A** e **TGFβ3+cyRGDC/Dex+(1.0%)**) in un rapporto numerico tra microparticelle e cellule di 4:1. Le microparticelle e le cellule sono state sospese in mezzo di coltura non differenziante e agitate per 2 ore in incubatore per assicurare un mescolamento uniforme tra le stesse.

Dopo 24 ore, su alcuni campioni di aggregati BM-hMSC/microparticelle **cyRGDC+(b)/lotto A** è stato sostituito il mezzo di coltura con il mezzo StemPro<sup>®</sup> *Chondrogenesis Differentiation* completo. In particolare quindi, sono stati studiati tre differenti condizioni di coltura delle BM-hMSC in presenza di: (a) microparticelle **cyRGDC+(b)/lotto A** in mezzo di coltura completo non differenziante, (b) **cyRGDC+(b)/lotto A** in mezzo di coltura condro-stimolante e (c) microparticelle **TGFβ3+cyRGDC+/Dex+(1.0%)** in mezzo di coltura non differenziante. L'attività metabolica delle BM-hMSC coltivate nelle tre differenti condizioni, è stata studiata dopo 1, 7, 14 e 21 giorni tramite saggio MTS seguendo le istruzioni del produttore. I risultati sono stati riportati come densità ottica assoluta misurata a 420 nm.

È stata eseguita inoltre un'analisi SEM dopo 21 giorni di coltura per tutti e tre i sistemi testati per osservare gli aggregati. In particolare i campioni sono stati lavati con DPBS pH 7.4 e fissati con formalina al 4% v/v per 5 ore, poi sono stati lavati e deidratati con una serie di soluzioni etanoliche (50%, 70%, 90% v/v ed etanolo puo), trattati con esametildisilazano, seccati sotto una cappa a flusso laminare e analizzati al SEM [Braet F. et al., 1997].

### **5.6.8 Analisi istologica**

Dopo 7, 14 e 21 giorni di coltura, gli aggregati **BM-hMSC/cyRGDC+(b)/lotto A** coltivati in mezzo di coltura non differenziante e in mezzo di coltura condro-stimolante e gli aggregati **BM-hMSC/TGFβ3+;cyRGDC+/Dex+(1.0%)** coltivati in mezzo non differenziante, sono stati fissati con formalina al 10% v/v. Successivamente i campioni fissati sono stati incorporati nella paraffina, quindi sezionati per le analisi istologiche e di immunoistochimica.

Il CD 90, il CD 105 e il collagene di tipo II sono stati valutati tramite analisi di immunoistochimica.

In particolare, dopo deparaffinizzazione, le sezioni sono state scaldate in una soluzione di citrato di sodio (pH 6.0) a 96°C per 20 minuti per il recupero degli antigeni. L'attività della perossidasi endogena è stata bloccata con perossido di idrogeno al 3% p/v in metanolo per 30 minuti. Le sezioni sono state poi trattate con *Background Sniper* per 15 minuti e incubati per 1 ora a

temperatura ambiente con l'anticorpo policlonale di coniglio CD 90 e CD 105 e l'anticorpo monoclonale di topo per il collagene di tipo II. Dopo 2 lavaggi con tampone fosfato (PBS), le sezioni tissutali sono stati incubati per 15 minuti con dei *probe*, e per 30 minuti con perossidasi di rafano a temperatura ambiente, in accordo con le istruzioni del produttore. Come substrato della perossidasi è stata usata la 3,3-diamminobenzidina (DAB) e dalla conseguente reazione (5 minuti), è stato ottenuto un precipitato marrone. Le sezioni sono state trattate con ematossilina, deidratate, lavate e trattate con *Eukitt*. L'anticorpo primario specifico è stato sostituito con PBS in sezioni di tessuto utilizzati come controlli negativi. Tutte le sezioni colorate sono state analizzate con un ingrandimento 200x con un microscopio Leica DMR collegato ad una camera digitale Nikon DS-Fil.

## **5.7 Microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub> reticolate chimicamente**

### **5.7.1 Produzione delle microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub>**

Le microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub> sono state ottenute mediante l'uso del Nano Spray Dryer B-90 (BÜCHI) come riportato nel paragrafo 5.6.1. In particolare l'HA-EDA-C<sub>18</sub> è stato solubilizzato in una miscela H<sub>2</sub>O/EtOH 1:1 v/v alla concentrazione di 0.75% p/v. La dispersione polimerica è stata filtrata tramite un filtro da 5µm e *spray dried* usando una *spray cap* di 7µm ad una temperatura di 117°C. Come gas essiccante è stata usata l'aria filtrata

e deumidificata ad una rate flow di 110 l/min con una conseguente pressione interna di 34 mbar con una *spray rate* del 100%.

### **5.7.2 Procedura di reticolazione chimica delle microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub>**

La procedura di reticolazione chimica ideata per ottenere il legame covalente microparticella-microparticella sfrutta l'addizione di *Michael* tra un gruppo tiolico e una porzione maleimmidica.

A tale scopo, un lotto di microparticelle è stato funzionalizzato con 2-imminotiolano. In particolare, 2.87 mg di 2-imminotiolano idrocloruro sono stati solubilizzati in 10 ml di DPBS. Successivamente aliquote da 5 mg di microparticelle sono state sospese in 0.76 ml della soluzione di 2-imminotiolano idrocloruro e dopo 1 ora di reazione a 37 °C in *orbital shaker*, sono stati effettuati dei lavaggi in DPBS pH 7.4.

La determinazione della funzionalizzazione superficiale con 2-imminotiolano è stata effettuata tramite il saggio colorimetrico con il reattivo di Ellman (NTBS). In particolare, dopo la funzionalizzazione con 2-imminotiolano, le microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub>, sono state lavate più volte in DPBS pH 7.4, una volta rapidamente in acqua, e poi congelate e liofilizzate. Sul campione così ottenuto è stato effettuato il saggio colorimetrico con il reattivo di Ellman, che converte i tioli liberi ed i disolfuri in solfo-derivati producendo una quantità equimolare di

2-nitro-5-tiobenzato (NTB<sup>-</sup>) che in acqua, a pH neutro o alcalino, si ionizza nel composto di colore giallo NTB<sup>2-</sup>. Il reattivo NTSB è stato preparato a partire dall'acido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico), come riportato in letteratura [Ellman G.L., 1958]. Il reattivo NTSB è stato aggiunto a ciascun *vial* sotto costante agitazione. La quantità di gruppi -SH liberi e di gruppi -S-S- è proporzionale all'assorbanza del NTB<sup>2-</sup>, che presenta un picco di assorbanza massima a 412 nm.

L'estere N-idrossi-succinimmidico dell'acido 4-maleimmidobutirrico (MLB-NHS) è stato prodotto come riportato nel paragrafo 5.4.3. Lotti di microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub> preparate come riportato nel paragrafo 5.7.1, sono state trattate con due diverse quantità di MLB-NHS per soddisfare i rapporti in peso tra mg di MLB-NHS e mg di microparticelle pari a 0.045 (**lotto A**) e 0.18 (**lotto B**).

In particolare, è stata preparata una soluzione madre con 3 mg di MLB-NHS solubilizzati in 3.87 ml di miscela DMSO/DPBS pH 7.4, 1:16 v/v. Successivamente, campioni da 5 mg di microparticelle sono stati trattati con 0.29 ml di soluzione madre di MLB-NHS e 1.44 ml di miscela DMSO/DPBS pH 7.4, con rapporto volumetrico 1:16 per ottenere le microparticelle siglate come **lotto A**. Altri campioni da 5 mg di microparticelle sono stati invece trattati con con 1.16 ml di soluzione madre di MLB-NHS e 0.57 ml di una di miscela DMSO/DPBS pH 7.4, con rapporto volumetrico 1:16 per ottenere le microparticelle siglate come

**lotto B.** La funzionalizzazione delle microparticelle è stata condotta a 37°C per 7 ore.

L'avvenuta funzionalizzazione è stata accertata qualitativamente tramite analisi ATR-FTIR.

Per la procedura di reticolazione chimica, le microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub> (5 mg) funzionalizzate con 2-imminotiolano sono state miscelate con quelle funzionalizzate con MLB-NHS (5 mg) (**lotto B**). Dopo mezz'ora dall'avvio della procedura di reticolazione chimica, sono stati aggiunti 35 µl di una soluzione di cy-RGDC alla concentrazione di 13.3 mg/ml in DPBS pH 7.4 (rapporto teorico tra le moli di cy-RGDC e le moli di MLB-NHS pari a 1). Dopo altri 30 minuti è stato aggiunto 1 ml di DPBS pH 7.4 ed il campione è stato incubato in *orbital shaker* per 24 ore.

La quantità di cy-RGDC legata alle microparticelle è stata calcolata tramite HPLC come riportato nel paragrafo 5.6.4, con un'analisi indiretta atta a quantificare il cy-RGDC non reagito [Zhongya C., et al., 2012]. In particolare il surnatante e le aliquote del mezzo di lavaggio sono stati raccolti e analizzati tramite HPLC usando una colonna C6-Phenyl termostata a 30 °C, una miscela acetonitrile (con 0.1% v/v di acido trifluoroacetico)/acqua (con 0.1% v/v di acido trifluoroacetico) 20:80 come fase eluente con una velocità di flusso di 1 ml/min, e la lettura UV è stata effettuata a 214 nm.

### 5.7.3 Formazione degli aggregati BM-hMSC/microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub> reticolate chimicamente

Un *crio-vial* di StemPro<sup>®</sup> BM-hMSC (1x10<sup>6</sup> cellule) è stato scongelato e sospeso nello StemPro<sup>®</sup> MSC SFM completo e le cellule sono state piastrate in fiasche da coltura T-75. Le BM-hMSC sono state usate dopo un passaggio. Le cellule sono state tripsinizzate e sospese ad una concentrazione di 800.000 cellule in 0.5 ml di mezzo basale senza l'aggiunta di supplementi e la sospensione così ottenuta è stata aggiunta alle microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub> (3 mg) funzionalizzate con 2-imminotiolano. Successivamente è stata effettuata una centrifugazione (1000 rpm, 3 minuti), è stato eliminato il surnatante e il centrifugato è stato aggiunto alle microparticelle (3 mg) funzionalizzate con MLB-NHS (**lotto B**). Il campione risultante (**campione B**) è stato leggermente miscelato con il vortex fino ad inizio reticolazione, momento in cui è stato possibile osservare un fenomeno di sineresi da parte dell'aggregato microparticellare. Le cellule sono state aggiunte, negli stessi rapporti, anche ad un campione di microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub> (3 mg) non funzionalizzate con 2-imminotiolano, il sistema è stato sottoposto a centrifugazione (1000 rpm, 3 minuti) e il centrifugato è stato miscelato con le microparticelle (3 mg) funzionalizzate con MLB-NHS (**lotto A**), il campione è stato siglato **campione A**.

Dopo mezz'ora dalla formazione di entrambi i campioni A e B, sono stati aggiunti 21  $\mu$ l di una soluzione di cy-RGDC alla concentrazione di 13.3 mg/ml in DPBS pH 7.4, per soddisfare un rapporto teorico tra le moli di cy-RGDC e le moli di MLB-NHS pari a 1 per il **campione A** (non reticolato) e a 0.25 per il **campione B** (reticolato chimicamente). Dopo un'altra mezz'ora è stato aggiunto il mezzo di coltura cellulare basale senza supplementi e i campioni sono stati incubati.

Dopo 24 ore, il mezzo di coltura senza supplementi è stato sostituito con il mezzo StemPro<sup>®</sup> *Chondrogenesis Differentiation* completo. Dopo 10 giorni di coltura con il mezzo di differenziamento condrogenico, i campioni sono stati coltivati con il mezzo di coltura non differenziante ovvero con lo StemPro<sup>®</sup> MSC SFM completo.

A giorni stabiliti (1, 12 e 21) è stato eseguito il saggio *LIVE&DEAD* operando una doppia colorazione tramite calceina AM ed etidio-omodimero-III (EthDIII), seguendo le indicazioni del produttore.

#### **5.7.4 Studio reologico sugli aggregati BM-hMSC/microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub>**

L'analisi reologica degli aggregati BM-hMSC/microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub> è stata eseguita all'interno della regione di linearità visco-elastica precedentemente determinata. Gli studi di reologia sono stati condotti ad una temperatura di  $25 \pm 0.01^\circ\text{C}$  e alla frequenza di 1 Hz, nel

range di *oscillation strain* compreso tra 0.1 e 10%. L'analisi è stata condotta con un sistema piatto-piatto usando una geometria di 8 mm. Sia il *peltier* che la geometria presentano zigrinature per evitare la fuoriuscita del campione al momento della pressione applicata dallo strumento. Sono stati sottoposti allo studio reologico dopo 1, 12 e 21 giorni di coltura il **campione A** (microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub> non reticolate coltivate con BM-hMSC), il **campione B** (microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub> reticolate coltivate con BM-hMSC) ed un terzo campione costituito da microparticelle di HA-EDA-C<sub>18</sub> reticolate, ottenute come il **campione B** ma incubate senza cellule (**campione C**), usato come controllo positivo della reticolazione chimica.

## **5.8 Preparazione e caratterizzazione di *hydrogel* di nuovi derivati del gellan gum**

### **5.8.1 Derivatizzazione del gellan gum con ottadecilammina**

Il gellan gum (GG) è stato trasformato nel sale di tetrabuttilammonio GG-TBA, seguendo la procedura riportata da Pawar S.N. ed Edgar K.J. per trasformare l'alginato nel suo sale di tetrabuttilammonio [Pawar S.N e Edgar K.J., 2011].

Per derivatizzare il GG con ottadecilammina (C<sub>18</sub>-NH<sub>2</sub>) è stata seguita la procedura sintetica riportata da Palumbo F.S. e collaboratori per funzionalizzare l'acido ialuronico con alchilammine [Palumbo F.S. et al.,

2016; Palumbo F.S. et al., 2015a e 2015b]. In particolare, 1 g di GG-TBA è stato solubilizzato in 88 ml di DMSO in un pallone da 250 ml per ottenere una concentrazione finale dell'1% p/v. Il pallone è stato posto in un bagno ad acqua a 40°C ed il GG-TBA è stato attivato aggiungendo, sotto costante agitazione, 8 ml di DMSO contenenti 36.5 mg o 18.25 mg di 4-NPBC per ottenere rispettivamente gli intermedi, non isolati, GG (1) e GG (2). Il bagno è stato mantenuto a questa temperatura per 4 ore, successivamente il pallone è stato trasferito in un bagno a 60°C e sono stati aggiunti 4 ml di DMSO contenenti 32.4 o 16.2 mg di C<sub>18</sub>-NH<sub>2</sub> sotto costante agitazione per ottenere i derivati GG-C<sub>18</sub> (1) e GG-C<sub>18</sub> (2) rispettivamente da GG (1) e GG (2). Successivamente è stato aggiunto 1 ml di soluzione satura di NaCl sotto agitazione per 30 minuti e ciascun prodotto è stato isolato tramite precipitazione in un eccesso di miscela di dietil etere/etil acetato 1:1 v/v e purificato trattandolo diverse volte con dietil etere/etil acetato 1:1 v/v a caldo, poi con una miscela etanolo/acqua 8:2 v/v, quindi con etanolo ed infine con acetone. La funzionalizzazione con C<sub>18</sub>-NH<sub>2</sub> è stata valutata qualitativamente tramite analisi ATR-FTIR e analisi DSC.

Ciascuno spettro ottenuto tramite spettroscopia ATR-FTIR è stato il risultato di 24 scansioni con una risoluzione di 4 cm<sup>-1</sup>.

Le analisi DSC sui campioni GG, GG-C<sub>18</sub> (1) e (2) e sulla miscela fisica di GG con C<sub>18</sub>-NH<sub>2</sub> sono state effettuate sotto flusso di N<sub>2</sub> (50 ml/min) su una massa di campione compresa tra 2 e 3 mg. La curva DSC è stata registrata

durante il processo di riscaldamento condotto da 20 a 300 °C ad una velocità di 20°C/min.

### **5.8.2 Analisi termo-reologica**

Il derivato GG-C<sub>18</sub> (2) è stato solubilizzato a tre diverse concentrazioni, rispettivamente all'1, 2 e 3% (p/v) in acqua deionizzata sotto agitazione a 37°C per diversi minuti (in dipendenza della concentrazione), il derivato GG-C<sub>18</sub> (1) è stato solubilizzato al 2% p/v in acqua deionizzata sotto agitazione a 37°C. Il GG invece, è stato disperso al 2% p/v in acqua deionizzata, la dispersione è stata progressivamente riscaldata fino a 90°C, ottenendo così la completa dissoluzione del materiale dopo 20-30 minuti [Oliveira J.T. et al., 2010].

Successivamente, i campioni sono stati posti a 50°C per 15 minuti, successivamente è stato condotto lo studio termo-reologico ponendo la soluzione calda di ciascun polimero sul piatto dello strumento. L'analisi è stata eseguita con un sistema piatto-piatto usando una geometria di 8 mm con zigrinature per evitare lo scivolamento del campione. La dipendenza dei moduli G' e G'' dalla temperatura è stata osservata durante il processo di raffreddamento del sistema da 50°C a 5°C e durante il successivo riscaldamento fino a 50°C ad una velocità di 0.5 °C/min e applicando uno *shear stress* costante di 0.1 Pa e una frequenza di 0.02 Hz.

### **5.8.3 Preparazione degli *hydrogel* di GG-C<sub>18</sub> (2) e GG**

Gli *hydrogel* di GG-C<sub>18</sub> (2) e GG sono stati preparati versando le dispersioni polimeriche, alla concentrazione del 2% p/v in acqua deionizzata, in *mold* di silicone; i campioni quindi sono stati raffreddati fino a temperatura ambiente. Successivamente i *mold* con le dispersioni polimeriche sono stati immersi in diverse soluzioni saline, in particolare in PBS 1x, PBS 10x e NaCl 0.9% p/v per 30 minuti. Sono stati così ottenuti *hydrogel* con un diametro di 7-8 mm e un'altezza di 4-5 mm.

### **5.8.4 Caratterizzazione degli *hydrogel***

#### **5.8.4.1 Studi di *swelling***

I campioni di GG-C<sub>18</sub> (2) e GG dopo solubilizzazione in acqua (2% p/v), sono stati versati (<100µl) in un *mold* di silicone, raffreddati, pesati (massa iniziale, Mi) e immersi in una soluzione di PBS 1x per 30 minuti. Gli *hydrogel* così ottenuti sono stati immersi in 1 ml di PBS pH 7.4 a 37 °C sotto costante agitazione. Ad intervalli di tempo stabiliti, gli *hydrogel* sono stati prelevati, sono stati lavati con una miscela acqua milliQ/etanolo 1:1 v/v, è stato rimosso il liquido in eccesso rapidamente con della carta assorbente, e sono stati pesati (massa finale, Mf). La percentuale di *swelling* (Sw%) è stata determinata in accordo con l'equazione seguente:

$$Sw\% = [(Mf - Mi) / Mi] \times 100$$

#### **5.8.4.2 Studio delle proprietà meccaniche degli *hydrogel***

*Hydrogel* di GG-C<sub>18</sub> (2) e GG sono stati preparati come precedentemente descritto in NaCl 0.9% p/v, in PBS 1x e in PBS 10x, partendo da dispersioni al 2% p/v di ciascun polimero. Successivamente per determinare il modulo di Young, definito come la pendenza iniziale della regione lineare della curva *stress-strain*, gli *hydrogel* sono stati compressi in direzione normale alla faccia circolare del campione cilindrico ad una velocità di 1 mm/min fino ad uno *strain* massimo dell'85%.

#### **5.8.4.3 Studio della stabilità degli *hydrogel***

È stato studiato l'effetto della catena alchilica sul profilo di stabilità degli *hydrogel* di GG-C<sub>18</sub> (2) in un mezzo acquoso senza ioni divalenti. Gli *hydrogel* ottenuti in PBS 1x, come precedentemente riportato, sono stati lavati rapidamente per rimuovere i sali di PBS, le superfici degli stessi sono state rapidamente asciugate con della carta per allontanare l'acqua in eccesso, quindi gli *hydrogel* sono stati pesati (massa iniziale, M<sub>i</sub>) ed immersi in 1 ml di soluzione di NaCl (0.9% p/v). Alcuni di questi campioni sono stati posti a 5°C e altri a 37°C sotto lenta agitazione. Dopo 24 ore, il mezzo è stato sostituito con un 1 ml di soluzione di NaCl (0.9% p/v). Ad intervalli di tempo stabiliti, gli *hydrogel* sono stati lavati con una soluzione di acqua distillata/etanolo 1:1 v/v per rimuovere gli ioni, sono stati asciugati con carta assorbente per allontanare l'acqua in eccesso e pesati (massa finale, M<sub>f</sub>). La

stabilità è stata espressa come % di massa recuperata (Mr%), calcolata in accordo con la seguente equazione:

$$Mr\%=(Mf/Mi)\times 100$$

## **5.9 Analisi statistica**

Tutti i risultati sono stati riportati come media  $\pm$  deviazione standard e, quando applicabile, l'analisi statistica per la significatività è stata eseguita attraverso il t-test di Student, usando la funzione statistica t-test di Microsoft Excel, assumendo una varianza non omogenea a due campioni e una distribuzione a due code; i valori con  $p < 0.05$  sono stati considerati statisticamente significativi.

## 6. Bibliografia

Agnello S., Gasperini L., Reis R.L., Mano J.F., Pitarresi G., Palumbo F.S. e Giammona G. Microfluidic production of hyaluronic acid derivative microfibers to control drug release. *Materials Letters*, **2016**, 182, 309–313.

Alvarez-Lorenzo C., Blanco-Fernandez B., Puga A. e Concheiro A. Crosslinked ionic polysaccharides for stimuli-sensitive drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2013**, 65, 1148–1171.

Alves da Silva M.L., Crawford A., Mundy J., Martins A., Araujo J.V., Hatton P.V., Reis R.L. e Neves N.M. Evaluation of extracellular matrix formation in polycaprolactone and starch-compounded polycaprolactone nanofiber meshes when seeded with bovine articular chondrocytes. *Tissue Engineering. Part A*, **2009**, 15, 377–385.

Alves da Silva M.L., Martins A., Costa-Pinto A.R., Correlo V.M., Sol P., Bhattacharya, M., Faria S. Reis R.L. e Neves N.M. Chondrogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells in chitosan-based scaffolds using a flow-perfusion bioreactor. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, **2011**, 5, 722–732.

Alves da Silva M.L., Martins A., Costa-Pinto A.R., Costa P., Faria S., Gomes M., Reis R.L. e Neves N.M. Cartilage tissue engineering using electrospun PCL nanofiber meshes and MSCs. *Biomacromolecules*, **2010**, 11, 3228–3236.

Anitha A., Sowmya S., Sudheesh Kumar P.T., Deepthi S., Chennazhi K.P., Ehrlich H., Tsurkan M., Jayakumar R. Chitin and chitosan in selected biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, **2014**, 39, 1644–1667.

Ansboro S., Hayes J.S., Barron V., Browne S., Howard L., Greiser U., Lalor P., Shannon F., Barry F.P., Pandit A. e Murphy J.M. A chondromimetic microsphere for in situ spatially controlled chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Journal of Controlled Release*, **2014**, 179, 42–51.

Araujo J.V., Martins A., Leonor I.B., Pinho E.D., Reis R.L. e Neves N. M. Surface controlled biomimetic coating of polycaprolactone nanofiber meshes to be used as bone extracellular matrix analogues. *Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition*, **2008**, 19, 1261–1278.

Atala A. Tissue engineering and regenerative medicine: concepts for clinical application. *Rejuvenation Res.*, **2004**, 7, 15-31.

Balazs E.A. Therapeutic use of hyaluronan. *Struct. Chem.*, **2009**, 20, 341–349.

Baldwin A.D. e Kiick K.L. Polysaccharide-Modified Synthetic Polymeric Biomaterials. *Biopolymers* **2010**, 94, 128–140.

Barrera D., Zylstra E., Lansbury P. e Langer R. Synthesis and RGD peptide modification of a new biodegradable copolymer system: poly(lactic acid-co-lysine) *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 11010–11011.

Barry J.J.A., Silva M.M.C.G., Shakesheff K.M., Howdle S.M. e Alexander M.R. Using Plasma Deposits to Promote Cell Population of the Porous Interior of Three-Dimensional Poly(D,L-Lactic Acid) Tissue-Engineering Scaffolds. *Adv. Funct. Mater.*, **2005**, 15, 1134–1140.

Beachley V. e Wen X. Polymer Nanofibrous Structures: Fabrication, Biofunctionalization and Cell Interaction. *Progress in Polymer Science*, **2010**, 35, 868-892.

Berndt P., Fields G.B. e Tirrell M. Synthetic lipidation of peptides and amino-acids monolayer structure and properties. *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 9515–9522.

Bhang S.H., Jeon J.Y., La W.G., Seong J.Y., Hwang J.W., Ryu S.E. e Kim B.S. Enhanced chondrogenic marker expression of human mesenchymal stem cells by interaction with both TGF- $\beta$ 3 and hyaluronic acid. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **2011**, 58, 271-276.

Bitter T. e Muir H.M. A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal. Biochem.*, **1962**, 4, 330-334.

Blaker J.J., Knowles J.C. e Day R.M. Novel fabrication techniques to produce microspheres by thermally induced phase separation for tissue engineering and drug delivery. *Acta Biomater.*, **2008**, 4, 264–272.

Blanco M.D., Sastre R.L., Teijón C., Olmo R. e Teijón J.M. 5-Fluorouracil-loaded microspheres prepared by spray-drying poly(D,L-lactide) and poly(lactide-co-glycolide) polymers: characterization and drug release. *J Microencapsul.*, **2005**, 22, 671-82.

Bonassar L.J. e Vacanti C.A. Tissue engineering: the first decade and beyond. *J Cell Biochem Suppl.*, **1998**, 30-31, 297-303.

Braet F., De Zanger R. e Wisse E. Drying cells for SEM, AFM and TEM by hexamethyldisilazane: a study on hepatic endothelial cells. *J. Microsc.*, **1997**, 186, 84-87.

Broderick E., Lyons H., Pembroke T., Byrne H., Murray B. e Hall M. The characterisation of a novel, covalently modified, amphiphilic alginate derivative, which retains gelling and non-toxic properties. *Journal of Colloid and Interface Science*, **2006**, 298, 154–161.

Brzoska M., Langer K., Coester C., Loitsch S., Wagner T.O.F. e Mallinckrodt C. Incorporation of biodegradable nanoparticles into human airway epithelium cells- in vitro study of the suitability as a vehicle for drug or gene delivery in pulmonary diseases. *Biochem Biophys Res Commun.*, **2004**, 318, 562–570.

Budyanto L., Goh Y.Q. e Ooi C.P. Fabrication of porous poly(L-lactide) (PLLA) scaffolds for tissue engineering using liquid-liquid phase separation and freeze extraction. *J Mater Sci Mater Med.*, **2009**, 20, 105–111.

Burdick J.A. e Prestwich G.D. Hyaluronic Acid Hydrogels for Biomedical Applications. *Adv. Mater.*, **2011**, 23, H41–H56.

Burdick J.A. e Vunjak-Novakovic G. Engineered microenvironments for controlled stem cell differentiation. *Tissue Engineering Part A*, **2009**, 15, 205-219.

Chau D.Y.S., Agashi K. e Shakesheff K.M. Microparticles as tissue engineering scaffolds: manufacture, modification and manipulation. *Materials Science and Technology*, **2008**, 24, 1031-1044.

Chen J., Peng C., Nie J., Kennedy J.F. e Ma G. Lyophilization as a novel approach for preparation of water resistant HA fiber membranes by crosslinked with EDC. *Carbohydr.Polym.*, **2014**, 102, 8–11.

- Chickering D., Jacob J. e Mathiowitz E. Poly(fumaric-co-sebacic) microspheres as oral drug delivery systems. *Biotechnol. Bioeng.*, **1996**, 52, 96–101.
- Choi C.H., Yi H., Hwang S., Weitz D.A. e Lee C.S. Microfluidic fabrication of complex-shaped microfibers by liquid template-aided multiphase microflow. *Lab Chip*, **2011**, 11, 1477-1483.
- Chung C. e Burdick J.A. Influence of three-dimensional hyaluronic acid microenvironments on mesenchymal stem cell chondrogenesis. *Tissue Eng. A*, **2009**, 15, 243-254.
- Chung H.J. e Park T.G. Injectable cellular aggregates prepared from biodegradable porous microspheres for adipose tissue engineering. *Tissue Eng. Part A*, **2009**, 15, 1391–1400.
- Chung H.J., Kim H.K., Yoon J.J. e Park T.G. Heparin immobilized porous PLGA microspheres for angiogenic growth factor delivery. *Pharm. Res.*, **2006**, 23, 1835–1841.
- Chung S., Martins A., Correlo V.M., Oliveira J.T., Marques A.P., Neves N. M., Mano J.F., Sousa R.A. e Reis R.L. Dependence of cell proliferation on the morphology of starch based scaffolds for tissue engineering. *Tissue Engineering. Part A*, **2008**, 14, 718.
- Chung S.W., Ingle N.P., Montero G.A., Kim S.H. e King M.W. Bioresorbable elastomeric vascular tissue engineering scaffolds via melt spinning and electrospinning. *Acta Biomater.*, **2010**, 6, 1958–1967.
- Cook A.D., Hrkach J.S., Gao N.N., Johnson I.M., Pajvani U.B., Cannizzaro S.M. e Langer R. Characterization and development of RGDpeptide-modified poly(lactic acid-co-lysine) as an interactive, resorbable biomaterial. *J. Biomed. Mater. Res.*, **1997**, 35, 513–523.
- Cooper J.A., Lu H.H., Ko F.K., Freeman J.W. e Laurencin C.T. Fiber-based tissue-engineered scaffold for ligament replacement: design considerations and in vitro evaluation. *Biomaterials*, **2005**, 26, 1523–1532.
- Correlo V.M., Boesel L.F., Pinho E., Costa-Pinto A.R., da Silva M.L.A., Bhattacharya M., Mano J.F. Neves N.M. e Reis R.L. Melt-based compression-molded scaffolds from chitosan-polyester blends and composites: Morphology and mechanical properties. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **2009**, 91, 489–504.
- Costa-Pinto A.R., Correlo V.M., Sol P.C., Bhattacharya M., Charbord P., Delorme B., Reis R.L. e Neves N.M. Osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells seeded on melt based chitosan scaffolds for bone tissue engineering applications. *Biomacromolecules*, **2009**, 10, 2067–2073.
- Coutinho D.F., Sant S.V., Shin H., Oliveira J.T., Gomes M.E., Neves N.M., Khademhosseini A. e Reis R.L. Modified Gellan Gum hydrogels with tunable physical and mechanical properties, *Biomaterials*, **2010**, 31, 7494-7502.
- Custodio C.A., Cerqueira M.T., Marques A.P., Reis R.L. e Mano J.F. Cell selective chitosan microparticles as injectable cell carriers for tissue regeneration. *Biomaterials*, **2015**, 43, 23-31.
- D'Sa R.A., Dickinson P.J., Raj J., Pierscionek B.K. e Meenan B.J. Inhibition of lens epithelial cell growth via immobilisation of hyaluronic acid on atmospheric pressure plasma modified polystyrene. *Soft Matter*, **2011**, 7, 608-617.

D'Agostino A., Stellavato A., Busico T., Papa A., Tirino V., Papaccio G., La Gatta A., De Rosa M. e Schiraldi C. In vitro analysis of the effects on wound healing of high- and low-molecular weight chains of hyaluronan and their hybrid H-HA/L-HA complexes. *BMC Cell Biol.*, **2015**, 16-19.

Dai L., Liu X.X., Liu Y.L. e Tong Z. Concentration dependence of critical exponents for gelation in Gellan gum aqueous solutions upon cooling. *Euro Polym J*, **2008**, 44, 4012-4019.

Daniele M.A., Boyd D.A., Adams A.A. e Ligler F.S. Microfluidic Strategies for Design and Assembly of Microfibers and Nanofibers with Tissue Engineering and Regenerative Medicine Applications. *Adv. Healthcare Mater.*, **2015**, 4, 11-28.

Di Bello C. e Bagno A. Iterazioni tra biomateriali e tessuti. *Patron Editore*, 33-35, **2009**.

Dias R.C.M., Góes A.M., Serakides R., Ayres E. e Oréface R.L. Porous biodegradable polyurethane nanocomposites: preparation, characterization, and biocompatibility tests. *Materials Research*, **2010**, 13, 211-218.

Dimer F.A., Ortiz M., Pohlmann A.R. e Guterres S.S. Inhalable resveratrol microparticles produced by vibrational atomization spray drying for treating pulmonary arterial hypertension. *J. Drug Delivery Sci. Technol.*, **2015**, 29, 152-158.

Edelman R., Russell R.G., Losonsky G., Tall B.D., Tacket C.O., Levine M.M. and Lewis D.H. Immunization of rabbits with enterotoxigenic *E. coli* colonization factor antigen (CFA/I) encapsulated in biodegradable microspheres of poly (lactide-co-glycolide). *Vaccine*, **1993**, 11, 155-158.

Elisseff J. Injectable cartilage tissue engineering. *Expert Opinion on Biological Therapy*, **2004**, 4, 1849-1859.

Ellman G.L. A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1958**, 74, 443-450.

Engler A.J., Griffin M.A., Sen S., Bonnemann C.G., Sweeney H.L. e Discher D.E. Myotubes differentiate optimally on substrates with tissue-like stiffness: pathological implications for soft or stiff microenvironments. *J. Cell Biol.*, **2004**, 166, 877-887.

Fatnassi M., Jacquart S., Brouillet F., Rey C., Combes C. e Girod Fullana S. Optimization of spray-dried hyaluronic acid microspheres to formulate drug-loaded bone substitute materials. *Powder Technol.*, **2014**, 255, 44-51.

Fields R. The rapid determination of amino groups with TNBS. *Methods Enzymol.*, **1972**, 25, 464-468.

Fiorica C., Pitarresi G., Palumbo F.S., Di Stefano M., Calascibetta F. e Giammona G. A new hyaluronic acid pH sensitive derivative obtained by ATRP for potential oral administration of proteins *Int. J. Pharm.*, **2013**, 457, 150-157.

Formhals A. Process and apparatus for preparing artificial threads. *US Patent* 1, 975, 504, **1934**.

Freed L.E., Marquis J.C., Nohria A., Emmanuel J., Mikos A.G. e Langer R. Neocartilage formation in vitro and in vivo using cells cultured on synthetic biodegradable polymers. *Journal of Biomedical Materials Research*, **1993**, 27, 11-23.

- Freiberg S. e Zhu X.X. Polymer microspheres for controlled drug release. *Int. J. Pharm.*, **2004**, 282, 1–18.
- Gerecht S., Burdick J.A., Ferreira L.S., Townsend S.A., Langer R. e Vunjak-Novakovic G. Hyaluronic acid hydrogel for controlled self-renewal and differentiation of human embryonic stem cells. *PNAS*, **2007**, 104, 11298-11303.
- Ghosh K., Pan Z., Guan E., Ge S., Liu Y., Nakamura T., Ren X.D., Rafailovich M.H. e Clark R.A.F. Cell adaptation to a physiologically relevant ECM mimic with different viscoelastic properties. *Biomaterials*, **2007**, 28, 671-679.
- Goessler U., Hormann K. e Riedel F. Tissue engineering with chondrocytes and function of extracellular matrix. *Int. J. Mol. Med.*, **2004**, 13, 505–513.
- Gomes M.E., Holtorf H.L., Reis R.L. e Mikos A.G. Influence of the porosity of starch-based fiber mesh scaffolds on the proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells cultured in a flow perfusion bioreactor. *Tissue Engineering*, **2006**, 12, 801–809.
- Gomes M.E., Sikavitsas V.I., Behraves E., Reis, R.L. e Mikos A.G. Influence of the porosity of starch-based fiber mesh scaffolds on the proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells cultured in a flow perfusion bioreactor. *Journal of Biomedical Materials Research, Part A*, **2003**, 67, 87–95.
- Grass G.D., Tolliver L.B., Bratoeva M. e Toole B.P. CD147, CD44, and the Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Signaling Pathway Cooperate to Regulate Breast Epithelial Cell Invasiveness. *The Journal of Biological Chemistry*, **2013**, 288, 26089-26104.
- Griffin D.R. e Kasko A.M. Photodegradable macromers and hydrogels for live cell encapsulation and release. *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, 134, 13103-13107.
- Guvendiren M. e Burdick J.A. Engineering synthetic hydrogel microenvironments to instruct stem cell. *Current opinion in Biotechnology*, **2013**, 24, 841-846.
- Guvendiren M., Lu H.D. e Burdick J.A. Shear-thinning hydrogels for biomedical applications. *Soft Matter*, **2012**, 8, 260-272.
- Hajimiri M., Shahverdi S., Kamalinia G. e Dinarvand R. Growth factor conjugation: strategies and applications. *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, **2015**, 103, 819-838.
- Hao J., Whitaker M.J., Wong B., Serhatkulu G., Shakesheff K.M. e Howdle S.M. Plasticization and spraying of poly (DL-lactic acid) using supercritical carbon dioxide: control of particle size. *J. Pharm. Sci.*, **2004**, 93, 1083–1090.
- Harrison R.H., St-Pierre J.P. e Stevens M.M. Tissue engineering and regenerative medicine: a year in review. *Tissue Eng Part B*, **2014**, 20, 1-16.
- He Q., Zhao Y., Chen B., Xiao Z., Zhang J., Chen L., Chen W., Deng F. e Dai J. Improved cellularization and angiogenesis using collagen scaffolds chemically conjugated with vascular endothelial growth factor. *Acta biomater.*, **2011**, 7, 1084-1093.
- Heijkants R.G.J.C., Van Tienen T.G., De Groot J.H., Pennings A.J., Buma P., Veth R.P.H. e Schouten A.J. Preparation of a polyurethane scaffold for tissue engineering made by a combination of salt leaching and freeze-drying of dioxane. *J Mater Sci.*, **2006**, 41, 2423–2428.

Heng D., Lee S.H., Ng W.K. e Tan R.B. The nano spray dryer B-90. *Expert Opin. Drug Deliv.*, **2011**, 8, 965-972.

Hersel U., Dahmen C. e Kessler H. RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials*, **2003**, 24, 4385-4415.

Ho S.T. e Hutmacher D.W. A comparison of micro CT with other techniques used in the characterization of scaffolds. *Biomaterials*, **2006**, 27, 1362-1376.

Holmes T.C., de Lacalle S., Su X., Liu G., Rich A. e Zhang S. Extensive neurite outgrowth and active synapse formation on self-assembling peptide scaffolds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2000**, 97, 6728-6733.

Hu Y.H., Winn S.R., Krajchich I. e Hollinger J.O. Porous polymer scaffolds surface-modified with arginine-glycine-aspartic acid enhance bone cell attachment and differentiation in vitro. *J. Biomed. Mater. Res., Part A*, **2003**, 64, 583-590.

Huh Y., Cho H.-J., Yoon I.-S., Choi M.-K., Kim J.S., Oh E., Chung S.-J., Shim C.-K. e Kim D.-D. Preparation and evaluation of spray-dried hyaluronic acid microspheres for intranasal delivery of fexofenadine hydrochloride. *European Journal of Pharmaceutical*, **2010**, 40, 9-15.

Hynes R.O. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, **1992**, 69, 11-25.

Irish J.D. A 5,500-year-old artificial human tooth from Egypt: A historical note. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, **2004**, 19, 645-647.

Jäger M., Böge C., Janissen R., Rohrbeck D., Hülsen T., Lensing-Höhn S., Krauspe R. and Herten M., Osteoblastic Potency of Bone Marrow Cells Cultivated on Functionalized Biometals With Cyclic RGD-peptide. *J. Biomed. Mater. Res. A*, **2013**, 101, 2905-2914.

Jansson P.E., Lindberg B., e Sandford P.A. Structural studies of gellan gum, an extracellular polysaccharide elaborated by *Pseudomonas elodea*. *Carbohydrate Research*, **1983**, 124, 135-139.

Jeong W., Kim J., Kim S., Lee S., Mensing G. e Beebe D. J. Hydrodynamic microfabrication via "on the fly" photopolymerization of microscale fibers and tubes. *Lab Chip* **2004**, 4, 576-580.

Ji Y., Ghosh K., Shu X.Z., Li B., Sokolov J.C., Prestwich G.D., Clark R.A. e Rafailovich M.H. Electrospun three-dimensional hyaluronic acid nanofibrous scaffolds. *Biomaterials*, **2006**, 27, 3782-3792.

Jung J.-H., Choi C.-H., Chung S., Chung Y.-M. e Lee C.-S. Microfluidic synthesis of a cell adhesive Janus polyurethane microfiber. *Lab on a Chip*, **2009**, 9, 2596-2602.

Kang E., Choi Y.Y., Chae S.K., Moon J.H., Chang J.Y. e Lee S.H. Microfluidic spinning of flat alginate fibers with grooves for cell-aligning scaffolds. *Adv. Mater.*, **2012**, 24, 4271-4277.

Kang E., Jeong G. S., Choi Y. Y., Lee K. H., Khademhosseini A. e Lee S.-H. Digitally tunable physicochemical coding of material composition and topography in continuous microfibers. *Nat. Mater.*, **2011**, 10, 877-883.

Kato Y. e Gospodarowicz D. Stimulation by Glucocorticoid of the Synthesis of Cartilage-Matrix Proteoglycans Produced by Rabbit Costal Chondrocytes in Vitro. *J. Biol. Chem.*, **1985**, 25, 2364-2373.

Khademhosseini A., Langer R., Borenstein J. e Vacanti J.P. Microscale technologies for tissue engineering and biology. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2006**, 103, 2480–2487.

Kim I.L., Mauck R.L. e Burdick J.A. Hydrogel design for cartilage tissue engineering: A cause study with hyaluronic acid. *Biomaterials*, **2011**, 32, 8771-8782.

Kim M., Erickson I.E., Choudhury M., Pleshko N. e Mauck R.L. Transient exposure to TGF- $\beta$ 3 improves the functional chondrogenesis of MSC-laden hyaluronic acid hydrogels. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, **2012**, 11, 92-101.

Kim S., Oh J. e Cha C. Enhancing the biocompatibility of microfluidics-assisted fabrication of cell-laden microgels with channel geometry. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **2016**, 147, 1-16.

Kim T.G., Chung H.J. e Park T.G. Macroporous and nanofibrous hyaluronic acid/collagen hybrid scaffold fabricated by concurrent electrospinning and deposition/leaching of salt particles. *Acta Biomater.*, **2008**, 4, 1611–1619.

Kimura Y. e Tabata Y. Experimental tissue regeneration by DDS technology of bio-signaling molecules. *J. Dermatol. Sci.*, **2007**, 47, 189–199.

Koehler K.C., Alge D.L., Anseth K.S. e Bowman C.N. A diels-alder modulated approach to control and sustain the release of dexamethasone and induce osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Biomaterials*, **2013**, 34, 4150–4158.

Langer R. Biomaterials in drug delivery and tissue engineering: one laboratory's experience. *Acc. Chem. Res.*, **2000**, 33, 94–101.

Langer R. e Vacanti J.P. Tissue engineering. *Science*, **1993**, 260, 920–926.

Lao L.H., Wang Y.J., Zhu Y., Zhang Y.Y. e Gao C.Y. Poly(lactide-coglycolide)/hydroxyapatite nanofibrous scaffolds fabricated by electrospinning for bone tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med.*, **2011**, 22, 1873–1884.

Lee K.-W., Wang S., Dadsetan M., Yaszemski M.J. e Lu L., Enhanced cell ingrowth and proliferation through three-dimensional nanocomposite scaffolds with controlled pore structures. *Biomacromolecules*, **2010**, 11, 682–689.

Lee Y.H., Lee J.H., An I.G., Kim C., Lee D.S., Lee Y.K. e Nam J.D. Electronspun dual-porosity structure and biodegradation morphology of montmorillonite reinforced PLLA nanocomposite scaffolds. *Biomaterials*, **2005**, 26, 3165–3172.

Lei Y., Gojgini S., Lam J. e Segura T. The spreading, migration and proliferation of mouse mesenchymal stem cells cultured inside hyaluronic acid hydrogels. *Biomaterials*, **2011**, 32, 39-47.

Le Roux M.A., Guilak F., e Setton L.A. Compressive and shear properties of alginate gel: Effects of sodium ions and alginate concentration. *Journal of Biomedical Materials Research*, **1999**, 47, 46–53.

Li Q., Wang J., Shahani S., Sun D.D.N., Sharma B., Elisseeff J.H., Leong K.W. Biodegradable and photocrosslinkable polyphosphoester hydrogel. *Biomaterials*, **2006**, 27, 1027-1034.

- Li Y.L., Rodrigues J. e Tomas H. Injectable and biodegradable hydrogels: gelation, biodegradation and biomedical applications. *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, 41, 2193-2221.
- Liu Tsang V. e Bhatia S.N. Three-dimensional tissue fabrication. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2004**, 56, 1635–1647.
- Liu X., Smith L., Wei G., Won Y. e Ma P.X. Surface engineering of nanofibrous poly(L-lactic acid) scaffolds via self-assembly technique for bone tissue engineering. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2005**, 1, 54–60.
- Liu X., Won Y. e Ma P.X. Surface modification of interconnected porous scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res., Part A*, **2005**, 74, 84–91.
- Liu X., Won Y. e Ma P.X. Porogen-induced surface modification of nanofibrous poly(L-lactic acid) scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, **2006**, 27, 3980–3987.
- Liu X.H., Jin X.B. e Ma P.X. Nanofibrous hollow microspheres self-assembled from star-shaped polymers as injectable cell carriers for knee repair. *Nat. Mater.*, **2011**, 10, 398–406.
- Liu Z., Jiao Y., Wang Y., Zhou C. e Zhang Z. Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2008**, 60, 1650–1662.
- Ma P.X. e Elisseff J. *Scaffolding in Tissue Engineering*. Boca Raton, FL: CRC Press, **2006**.
- Ma P.X., Tissue engineering, in: Kroschwitz J.I. (Ed.), *Third ed., Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, JohnWiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, **2005**, vol. 12, 261–291.
- Maharjan A.S., Pilling D. e Gomer R.H. High and Low Molecular Weight Hyaluronic Acid Differentially Regulate Human Fibrocyte Differentiation. *PLoS One*, **2011**, 6, e26078.
- Marklein R.A. e Burdick J.A. Controlling stem cell fate with material design. *Adv. Mater.*, **2010**, 22, 175–189.
- Martin K.H., Slack J.K., Boerner S.A., Martin C.C. e Parsons J.T. Integrin connections map: to infinity and beyond. *Science*, **2002**, 296, 1652–1653.
- Martins A., Alves da Silva M.L., Faria S., Marques A.P., Reis R.L. e Neves N.M. The influence of patterned nanofiber meshes on human mesenchymal stem cell osteogenesis. *Macromolecular Bioscience*, **2011**, 11, 978–987.
- Martins A., Araujo J.V., Reis R.L. e Neves N.M. Electrospun nanostructured scaffolds for tissue engineering applications. *Nanomedicine*, **2007**, 2, 929–942.
- Martins A., Duarte A.R.C., Faria S., Marques A.P., Reis R. L. e Neves N. M. Osteogenic induction of hBMSCs by electrospun scaffolds with dexamethasone release functionality. *Biomaterials*, **2010**, 31, 5875–5885.
- Martins A., Pinho E.D., Correlo V.M., Faria S., Marques A.P., Reis R.L. e Neves N.M. Biodegradable nanofibers-reinforced microfibrillar composite scaffolds for bone tissue engineering. *Tissue Engineering - Part A*, **2010**, 16, 3599–3609.
- Martins A., Reis R.L. e Neves N.M. Electrospinning: Processing technique for tissue engineering scaffolding. *International Materials Reviews*, **2008**, 53, 257–274.

Mason C. e Dunnill P. A brief definition of regenerative medicine. [Editorial] *Regenerative Medicine*, **2008**, 3, 1–5.

Masters K. ‘Spray drying handbook’, 4th edn; **1985**, Bath, Pitman.

Masters K.S. Covalent growth factor immobilization strategies for tissue repair and regeneration. *Macromol. Biosci.*, **2011**, 11, 1149-1163.

Matricardi P., Di Meo C., Coviello T., Hennink W. and Alhaique F. Interpenetrating polymer networks polysaccharide hydrogels for drug delivery and tissue engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2013**, 65, 1172–1187.

Mauro N., Chiellini F., Bartoli C., Gazzari M., Laus M., Antonioli D., Griffiths P., Manfredi A., Ranucci E. e Ferruti P. RGD-mimic polyamidoamine-montmorillonite composites with tunable stiffness as scaffolds for bone tissue-engineering applications. *J. Tissue Eng. Regen. M.*, **2016**, DOI: 10.1002/term.2115.

Mercier N.R., Costantino H.R., Tracy M.A. e Bonassar L.J. Poly(lactide-co-glicolide) microspheres as a moldable scaffold for cartilage tissue engineering. *Biomaterials*. **2005**, 26, 1945–1952.

Mikos A.G. e Temenoff J.S. Formation of highly porous biodegradable scaffolds for tissue engineering. *Electronic Journal of Biotechnology*, **2000**, 3, 114–119.

Mikos A.G., Bao Y., Cima L.G., Ingber D.E., Vacanti J.P. e Langer R. Preparation of poly(glycolic acid) bonded fiber structures for cell attachment and transplantation. *Journal of Biomedical Materials Research*, **1993**, 27, 183–189.

Milas M., Shi X. e Rinaudo M. On the physicochemical properties of gellan gum. *Biopolymers*, **1990**, 30, 451-464.

Misra S., Heldin P., Hascall V.C., Karamanos N.K., Skandalis S.S., Markwald R.R. e Ghatak S. Hyaluronan–CD44 interactions as potential targets for cancer therapy. *Expert Opin. Drug Delivery*, **2010**, 7, 681-703.

Miyamoto S., Katz B.Z., Lafrenie R.M. e Yamada K.M. Fibronectin and integrins in cell adhesion, signaling, and morphogenesis. *Ann N Y Acad Sci.*, **1998**, 857, 119-129.

Miyoshi E., Takaya T. e Nishinari K. Rheological and thermal studies of gel-sol transition in Gellan gum aqueous solutions. *Carbohydr Polym*, **1996**, 30, 109-119.

Mkedder I., Travelet C., Durand-Terrasson A., Halila S., Dubreuil F. e Borsali R. Preparation and enzymatic hydrolysis of nanoparticles made from single xyloglucan polysaccharide chain. *Carbohydr. Polym.*, **2013**, 94, 934–939.

Morton W.J. Method of dispersing fluids. US patent, 705, 691, **1902**.

Muller B.W. e Fischer W. ‘Method and apparatus for the manufacture of a product having a substance embedded in a carrier’, US patent no. 5043280, **1991**.

Müller R., Abke J., Schnell E., Scharnweber D., Kujat R., Englert C., Taheri D., Nerlich M. e Angele P. Influence of Surface Pretreatment of Titanium- and Cobaltbased Biomaterials on Covalent Immobilization of Fibrillar Collagen. *Biomaterials*, **2006**, 27, 4059–4068.

Na K., Park J. H., Kim S. W., Sun B. K., Woo D. G., Chung H.-M. E Park K.-H. Delivery of dexamethasone, ascorbate, and growth factor (TGF  $\beta$ -3) in thermo-reversible hydrogel constructs embedded with rabbit chondrocytes. *Biomaterials*, **2006**, 27, 5951–5957.

Nagahama K., Ouchi T. e Ohya Y. Temperature-induced hydrogels through self-assembly of cholesterol-substituted star PEG-b-PLLA copolymers: an injectable scaffold for tissue engineering. *Adv Funct Mater.*, **2008**, 18, 1220–1231.

Nandi S.K., Kundu B., Mahato A., Thakur N.L., Joardar S.N. e Mandal B.B. *In vitro* and *in vivo* evaluation of the marine sponge skeleton as a bone mimicking biomaterial. *Integrative Biology*, **2015**, 7, 250-262.

Nihant N., Grandfils C., Jerome R. e Teyssie P. Microencapsulation by coacervation of PLGA: IV. Effect of the processing parameters on coacervation and encapsulation. *J. Control. Release*, **1995**, 35, 117–125.

Nishinari K., Miyoshi E., Takaya T. e Williams P.A. Rheological and DSC studies on the interaction between gellan gum and konjac glucomannan. *Carbohydr. Polym.*, **1996**, 30, 193-207.

Numata M., Takigami Y., Takayama M., Kozawa T. e Hirose N. Hierarchical Supramolecular Spinning of Nanofibers in a Microfluidic Channel: Tuning Nanostructures at a Dynamic Interface. *Chem. Eur. J.* **2012**, 18, 13008-13017.

Ogawa E. Conformational properties of polysaccharide gellan gum in aqueous solutions. *Recent. Res. Dev. Macromol. Res.*, **1997**, 2, 81-94.

Ogawa Y., Yamamoto M., Takada S., Okada H. e Shimamoto T. Controlled-release of leuprolide acetate from polylactic acid or copoly(lactic/glycolic) acid microcapsules: influence of molecular weight and copolymer ratio of polymer. *Chem. Pharm. Bull.*, **1988**, 36, 1502–1507.

Oh S.H. e Lee J.H. Hydrophilization of synthetic biodegradable polymer scaffolds for improved cell/tissue compatibility. *Biomed. Mater.*, **2013**, 8, 014101-014110.

Oliveira J., Kotobuki N., Marques A.P., Pirraco R.P., Benesh J., Hirose M., Costa S.A., Mano J.F., Ohgushi H. e Reis R.L. Surface engineered carboxymethylchitosan/ poly(amidoamine) dendrimer nanoparticles for intracellular targeting. *Adv. Funct. Mater.*, **2008**, 118, 1840–1853.

Oliveira J.T., Crawford A., Mundy J.L., Sol P.C., Correlo V.M., Bhattacharya M. Neves N.M. Hatton P.V. e Reis R.L. Novel melt-processable chitosan-polybutylene succinate fibre scaffolds for cartilage tissue engineering. *Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition*, **2011**, 22, 773–788.

Oliveira J.T., Martins L., Picciochi R., Malafaya P.B., Sousa R.A., Neves N.M., Mano J.F. e Reis R.L. Gellan gum: A new biomaterial for cartilage tissue engineering applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **2010**, 93, 852–863.

Ombelli M., Costello L., Postle C., Anantharaman V., Meng Q.C., Composto R.J. e Eckmann D.M. Competitive protein adsorption on polysaccharide and hyaluronate modified surfaces. *Biofouling*, **2011**, 27, 505-518.

Onoe H., Okitsu T., Itou A., Kato-Negishi M., Gojo R., Kiriya D., Sato K., Miura S., Iwanaga S., Kuribayashi-Shigetomi K., Matsunaga Y.T., Shimoyama Y. e Takeuchi S. Metre-long cell-laden microfibres exhibit tissue morphologies and functions. *Nat. Mater.*, 2013, 12, 584-590.

Owen S.C. e Shoichet M.S. Design of three-dimensional biomimetic scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res. A*, **2010**, 94A, 1321–1331.

Palumbo F.S., Agnello S., Fiorica C., Pitarresi G., Puleio R., Tamburello A., Loria R. e Giammona G. Hyaluronic Acid Derivative with Improved Versatility for Processing and Biological Functionalization. *Macromol. Biosci.*, **2016**, 16, 1485-1496.

Palumbo F.S., Fiorica C., Di Stefano M., Pitarresi G., Gulino A., Agnello S. e Giammona G. In situ forming hydrogels of hyaluronic acid and inulin derivatives for cartilage regeneration. *Carbohydr. Polym.*, **2015b**, 122, 408–416.

Palumbo F.S., Fiorica C., Pitarresi G., Agnello S. e Giammona G. Interpenetrated 3D porous scaffolds of silk fibroin with an amino and octadecyl functionalized hyaluronic acid. *RSC Advances*, **2015a**, 5, 61440–61448.

Palumbo F.S., Pitarresi G., Fiorica C., Matricardi P., Albanese A. e Giammona G. In situ forming hydrogels of new amino hyaluronic acid/benzoyl-cysteine derivatives as potential scaffolds for cartilage regeneration. *Soft Matter*, **2012**, 8, 4918-4927.

Palumbo F.S., Pitarresi G., Mandracchia D., Tripodo G. e Giammona G. New graft copolymers of hyaluronic acid and polylactic acid: Synthesis and characterization. *Carbohydr. Polym.*, **2006**, 66, 379-385.

Palumbo F.S., Puleio R., Fiorica C., Pitarresi G., Loria G.R., Cassata G. e Giammona G. Matrices of a hydrophobically functionalized hyaluronic acid derivative for the locoregional tumour treatment. *Acta Biomaterialia*, **2015c**, 25, 205–215.

Pawar S.N. e Edgar K.J. Chemical Modification of Alginates in Organic Solvent Systems. *Biomacromolecules*, **2011**, 12, 4095–4103.

Peck M., Dusserre N., McAllister T.N. e L'Heureux N. Tissue engineering by self-assembly. *Mater Today*, **2011**, 14, 218–224.

Pelletier S., Hubert P., Lapique F., Payan E. e Dellacherie E. Amphiphilic derivatives of sodium alginate and hyaluronate: synthesis and physico-chemical properties of aqueous dilute solutions. *Carbohydrate Polymers*, **2000**, 43, 343–349.

Pitarresi G., Fiorica C., Palumbo F.S., Calascibetta F. e Giammona G. Polyaspartamide-poly lactide electrospun scaffolds for potential topical release of Ibuprofen. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **2012**, 100, 1565-1572.

Pitarresi G., Fiorica C., Palumbo F.S., Rigogliuso S., Ghersi G. e Giammona G. Heparin functionalized polyaspartamide/polyester scaffold for potential blood vessel regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **2013**, 102, 1334-1341.

Prestwich G.D. Hyaluronic acid-based clinical biomaterials derived for cell and molecule delivery in regenerative medicine. *J. Controlled Release*, **2011**, 155, 193–199.

Puppi D., Piras A.M., Chiellini F., Chiellini E., Martins A., Leonor I.B., Neves N.M. e Reis R.L. Optimized electro- and wet-spinning techniques for the production of polymeric fibrous scaffolds loaded with bisphosphonate and hydroxyapatite. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, **2011**, 5, 253–263.

Quaglia F., De Rosa G., Granata E., Ungaro F., Fattal E. e La Rotonda M.I. Feeding liquid, non-ionic surfactant and cyclodextrin affect the properties of insulin-loaded poly(lactide-co-glycolide) microspheres prepared by spray-drying. *Journal of Controlled Release*, **2003**, 86, 267–278.

Ramesh S., Sivasamy A. e Kim J.-H. Synthesis and characterization of maleimide-functionalized polystyrene-SiO<sub>2</sub>/TiO<sub>2</sub> hybrid nanocomposites by sol-gel process. *Nanoscale Res. Lett.*, **2012**, 7:350.

Rao S.S. e Winter J.O. Adhesion molecule-modified biomaterials for neural tissue engineering. *Frontiers in neuroengineering*, **2009**, 2, 1-14.

Re'em T., Tsur-Gang O. e Cohen S. The effect of immobilized RGD peptide in macroporous alginate scaffolds on TGFβ<sub>1</sub>-induced chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *Biomaterials*, **2010**, 31, 6746-6755.

Roemer D., Buescher H.H., Hill R.C., Pless J., Bauer W., Cardinaux F., Clossé A., Hauser D. e Huguenin R. A synthetic enkephalin analogue with prolonged parenteral and oral analgesic activity. *Nature*, **1977**, 268, 547–549.

Sachlos E., Reis N., Ainsley C., Derby B. e Czernuszka J.T. Novel collagen scaffolds with predefined internal morphology made by solid freeform fabrication. *Biomaterials*, **2003**, 24, 1487–1497.

Sackmann E.K., Fulton A.L. e Beebe D.J. The present and future role of microfluidics in biomedical research. *Nature*, **2014**, 507, 181-189.

Salgado A.J., Coutinho O.P. e Reis R.L. Bone tissue engineering: State of the art and future trends. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Macromolecular Bioscience*, **2004**, 4, 743–765.

Salinas C.N. e Anseth K.S. The enhancement of chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by enzymatically regulated RGD functionalities. *Biomaterials*, **2008**, 29, 2370-2377.

Schanté C.E., Zuber G., Herlin C. e Vandamme T.F. Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*, **2011**, 85, 469-489.

Schledzewski K., Falkowski M., Moldenhauer G., Metharom P., Kzhyshkowska J., Ganss R., Demory A., Falkowska-Hansen B., Kurzen H., Ugurel S., Geginat G., Arnold B. e Goerdt S. Lymphatic endothelium-specific hyaluronan receptor LYVE-1 is expressed by stabilin-1+, F4/80+, CD11b+ macrophages in malignant tumours and wound healing tissue in vivo and in bone marrow cultures in vitro: implications for the assessment of lymphangiogenesis. *J Pathol.*, **2006**, 209, 67-77.

Schnur J.M., Price R., Schoen P., Yager P., Calvert J.M., Georger J. e Singh A. Lipid-based tubule microstructures. *Thin Solid Films*, **1987**, 152, 181–206.

Schwartz M.A. e Ginsberg M.H. Networks and crosstalk: integrin signalling spreads. *Natl Cell Biol.*, **2002**, 4, E65–68.

Seliktar D. Designing cell-compatible hydrogels for biomedical applications. *Science*, **2012**, 336, 1124-1128.

Sherman L., Sleeman J., Herrlich P. e Ponta H. Hyaluronate receptors: key players in growth, differentiation, migration and tumor progression. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **1994**, 6, 726–733.

Shintani N. e Hunziker E.B. Differential effects of dexamethasone on the chondrogenesis of mesenchymal stromal cells: influence of microenvironment, tissue origin and growth factor. *European Cells and Materials*, **2011**, 22, 302-320.

Shoichet M.S. Polymer scaffolds for biomaterials applications. *Macromolecules*, **2010**, 43, 581–591.

Shu X.Z., Liu Y., Palumbo F.S., Luo Y. e Prestwich G.D. In situ crosslinkable hyaluronan hydrogels for tissue engineering. *Biomaterials* **2004**, 25, 1339-1348.

Silva-Correia J., Oliveira J.M., Caridade S.G., Oliveira J.T., Sousa R.A., Mano J.F. e Reis R.L. Gellan gum-based hydrogels for intervertebral disc tissue engineering applications. *Journal of Tissue Engineering Regenerative Medicine*, **2011**, 5, 97–107.

Simonoska C.M., Glavas D.M. e Goracinova K. Chitosan coated Ca–alginate microparticles loaded with budesonide for delivery to the inflamed colonic mucosa. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **2008**, 68, 565–578.

Singh B.N. e Kim K.H. Effects of divalent cations on drug encapsulation efficiency of deacylated Gellan gum. *J Microencapsul.*, **2005**, 22, 761-771.

Slaughter B.V., Khurshid S.S., Fisher O.Z., Khademhosseini A. e Peppas N.A. Hydrogels in regenerative medicine. *Adv. Mater.*, **2009**, 21, 3307-3329.

Smith I.O., Liu X.H., Smith L.A. e Ma P.X. Nanostructured polymer scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.*, **2009**, 1, 226–236.

Sokolsky-Papkov M., Agashi K., Olaye A., Shakesheff K. e Domb A.J., Polymer carriers for drug delivery in tissue engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2007**, 59, 187–206.

Soliman S., Pagliari S., Rinaldi A., Forte G., Fiaccavento R., Pagliari F., Franzese O., Minieri M., Di Nardo P., Licoccia S. e Traversa E. Multiscale three-dimensional scaffolds for soft tissue engineering via multimodal electrospinning. *Acta Biomater.*, **2010**, 6, 1227–1237.

Spiller K.L., Maher S.A. e Lowman A.M. Hydrogels for the repair of articular cartilage defects. *Tissue Eng. Part B Rev.*, **2011**, 17, 281-99.

Sridhar B.V., Doyle N.R., Randolph M.A. e Anseth K.S. Covalently tethered TGF- $\beta$ 1 with encapsulated chondrocytes in a PEG hydrogel system enhances extracellular matrix production. *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, **2014**, 102, 4464-4472.

Sukarto A., Yu C., Flynn L.E., e Amsden B.G. Co-delivery of adipose-derived stem cells and growth factor-loaded microspheres in RGD-grafted N-methacrylate glycol chitosan gels for focal chondral repair. *Biomacromolecules*, **2012**, 13, 2490-2502.

Sultana N. e Wang M. PHBV/PLLA-based composite scaffolds fabricated using an emulsion freezing/freeze-drying technique for bone tissue engineering: surface modification and in vitro biological evaluation. *Biofabrication*, **2012**, 4, 015003.

Tabata Y. Biomaterial technology for tissue engineering applications. *J. R. Soc. Interface*, **2009**, 6, S311–S324.

Takano T., Takigawa M. e Suzuki F. Stimulation by glucocorticoids of the differentiated phenotype of chondrocytes and the proliferation of rabbit costal chondrocytes in culture. *J. Biochem.*, **1985**, 97, 1093.

Tan H.P, Wu J.D., Huang D.J. e Gao C.Y. The design of biodegradable microcarriers for induced cell aggregation. *Macromol. Biosci.*, **2010**, 10, 156–163.

Tangtrongsup S. e Kisiday J.D. Effects of Dexamethasone Concentration and Timing of Exposure on Chondrogenesis of Equine Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Cartilage*, **2016**, 7, 92-103.

Thangawng A.L., Howell P.B., Spillmann C.M., Naciri J. e Ligler F.S. UV polymerization of hydrodynamically shaped fibers. *Lab Chip*, **2011**, 11, 1157-1160.

Thomasin C., Merkle H.P. and Gander B.A. Physico-chemical parameters governing protein microencapsulation into biodegradable polyesters by coacervation. *Int. J. Pharm.*, **1997**, 147, 173–186.

Tibbitt M.W. e Anseth K.S. Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture, *Biotechnol. Bioeng.*, **2009**, 103, 655-663.

Toole B.P. Hyaluronan in morphogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2001**, 12, 79-87.

Uyama T., Kitagawa H. and Sugahara K. *Comprehensive Glycoscience*, (Ed.: H. Kamerling), Elsevier, Oxford, **2007**, 79–104.

Vacanti J.P. e Langer R. Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *Lancet* **1999**, 354, 32–34.

van de Weert M., Hennink W.E. e Jiskoot W. Protein Instability in Poly(Lactic-co-Glycolic Acid) Microparticles. *Pharm. Res.*, **2000**, 17, 1159–1167.

Vårum K.M., Anthonsen M.W., Grasdalen H. e Smidsrod O. Determination of the degree of N-acetylation and the distribution of N-acetyl groups in partially N-deacetylated chitins (chitosans) by high-field N.M.R. spectroscopy. *Carbohydrate Research*, **1991**, 211, 17–23.

Vasir J.K., Tambwekar K. e Garg S. Bioadhesive microspheres as a controlled drug delivery system. *Int. J. Pharm.*, **2003**, 255, 13–32.

Vlad S., Ciobanu C., Macocinschi D., Filip D. e Spiridon I. Evaluation of some polyetherurethane elastomers for chemicals, oils and solvents resistance. *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials*, **2009**, 11, 1160–1168.

Wagenaar B.W. e Muller B.W. Piroxicam release from spray-dried biodegradable microspheres. *Biomaterials*, **1994**, 15, 49–54.

Wan Y., Yang J., Yang J., Bei J. e Wang S. Cell adhesion on gaseous plasma modified poly (L-lactide) surface under shear stress field. *Biomaterials*, **2003**, 24, 3757–3764.

Wang C.M., Varshney R.R. e Wang D.A. Therapeutic cell delivery and fate control in hydrogels and hydrogel hybrids. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, 62, 699-710.

Wang S.J. e Bourguignon L.Y.W. Role of Hyaluronan-Mediated CD44 Signaling in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Progression and Chemoresistance. *The American Journal of Pathology*, **2011**, 178, 956-963.

Watts P.J., Davies M.C. e Melia C.D. Microencapsulation using emulsification/solvent evaporation: an overview of techniques and applications. *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst.*, **1990**, 7, 235–259.

Wei G., Pettway G.J., McCauley L.K. e Ma P.X. The release profiles and bioactivity of parathyroid hormone from poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres. *Biomaterials*, **2004**, 25 345–352.

Weissleder R., Kelly K., Sun E.Y., Shtatland T. e Josephson L. Cell-specific targeting of nanoparticles by multivalent attachment of small molecules. *Nat Biotechnol.*, **2005**, 23, 1418–1423.

Whitesides G. M. The origins and the future of microfluidics. *Nature*, **2006**, 442, 368-373.

Whitesides G.M. e Grzybowski B. Self-assembly at all scales. *Science*, **2002**, 295, 2418–2421.

Whittlesey K.J. e Shea L.D. Delivery systems for small molecule drugs, proteins, and DNA: the neuroscience/biomaterial interface. *Exp. Neurol.*, **2004**, 190, 1–16.

Wohlrab S., Müller S., Schmidt A., Neubauer S., Kessler H., Leal-Egaña A. and Scheibel T., Cell adhesion and proliferation on RGD-modified recombinant spider silk proteins. *Biomaterials*, **2012**, 33, 6650–6659.

Wu S.C., Chen C.H., Chang J.K., Fu Y.C., Wang C.K., Eswaramoorthy R., Lin Y.S., Wang Y.H., Lin S.Y., Wang G.J. e Ho M.L. Hyaluronan initiates chondrogenesis mainly via CD44 in human adipose-derived stem cells. *J. Appl. Physiol.*, **2013**, 114, 1610-1618.

Wu X.S. ‘Encyclopedic handbook of biomaterials and bioengineering’, (ed. Wise et al.), **1995a**, 1015–1054, New York, Marcel Dekker.

Wu X.S. ‘Encyclopedic handbook of biomaterials and bioengineering’, (ed. Wise et al.), **1995b**, 1151–1200, New York, Marcel Dekker.

Yao J., Tao S. L. e Young M. J. Synthetic Polymer Scaffolds for Stem Cell Transplantation in Retinal Tissue Engineering. *Polym.*, **2011**, 3, 899–914.

Yu Y., Wen H., Ma J., Lykkemark S., Xu H. e Qin J.H. Flexible fabrication of biomimetic bamboo-like hybrid microfibers. *Adv. Mater.*, **2014**, 26, 2494-2499.

Yu Y.C., Roontga V., Daragan V.A., Mayo K.H., Tirrell M. e Fields G.B. Structure and dynamics of peptide-amphiphiles incorporating triple-helical proteinlike molecular architecture. *Biochemistry*, **1999**, 38, 1659–1668.

Yu Y.C., Tirrell M. e Fields G.B. Minimal lipidation stabilizes protein-like molecular architecture. *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 9979–9987.

Zhang S., Holmes T., Lockshin C. e Rich A. Spontaneous assembly of a self-complementary oligopeptide to form a stable macroscopic membrane. PNAS, **1993**, 90, 3334–3338.

Zhongya C., Jiabin D., Yan Z. e Tao T. Cyclic RGD peptide-modified liposomal drug delivery system: enhanced cellular uptake in vitro and improved pharmacokinetics in rats. Int. J. Nanomed., **2012**, 7, 3803-3811.

Zohuriaan M.J. e Shokrolahi F. Thermal studies on natural and modified gums. Polymer Testing, **2004**, 23, 575–579.

Zong X., Bien H., Chung C.Y., Yin L., Fang D., Hsiao B.S., Chu B. e Entcheva E. Electrospun fine-textured scaffolds for heart tissue constructs. Biomaterials, **2005**, 26, 5330–5338.