



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE FARMACEUTICHE

**CENTRO INTERDIPARTIMENTALE DI RICERCA E DI SERVIZI PER LA
BIOLOGIA E LA MEDICINA DELLA RIGENERAZIONE**

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA E MEDICINA DELLA
RIGENERAZIONE
INDIRIZZO INGEGNERIA DEI TESSUTI E DEI TRAPIANTI

XXIII CICLO

TESI DI DOTTORATO

REALIZZAZIONE DI SCAFFOLDS TRIDIMENSIONALI IN VITRO PER LA RIGENERAZIONE OSSEA

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Pier Paolo Parnigotto

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Maria Teresa Conconi

Supervisore: Ch.mo Prof. Claudio Grandi

Dottorando : Dott. Piergiorgio Paganin

Ogni persona che incontri è meglio di te in qualcosa; in quella cosa impara

(Mahatma Gandhi)

INDICE

RIASSUNTO	pag. 1
ABSTRACT	pag.4
INTRODUZIONE	pag.7
1. Ingegneria tessutale ossea	pag7
2. Biomateriali per l'ingegneria tessutale ossea	pag 9
2.1 Metalli e materiale ceramico	pag 9
2.2 Polimeri naturali	pag 10
2.3 Polimeri sintetici	pag 10
2.4 Policaprolattone	pag 13
3. Porosità	pag 14
4. Tecniche di produzione di scaffolds per la rigenerazione ossea	pag 16
5. Modelli cellulari	pag 18
5.1 Linee cellulari preosteoblastiche	pag 18
5.2 Cellule staminali mesenchimali	pag 19
6. Microtomografia computerizzata (MicroCT)	pag 20
SCOPO DELLA TESI	pag 22

MATERIALI E METODI	pag 23
1. Preparazione dello scaffold polimerico	pag 23
1.1 PCL senza porogeno (PCL-WP)	pag 23
1.2 PCL con Polietilenglicole (PCL-PEG)	pag 23
1.3 PCL con saccarosio (PCL-S)	pag 24
1.4 PCL con sfere di fruttosio (PCL-F)	pag 24
1.5 PCL con sfere di alginato di calcio e PCL con fili di alginato di calcio	pag 25
2. Preparazione di idrossiapatite	pag 25
3. Preparazione della polvere d'osso	pag 26
4. PCL-AT₂ con idrossiapatite o con polvere d'osso	pag 26
5. Caratterizzazione strutturale degli scaffold di PCL	pag 28
6. Riproduzione di falange umana realizzata con policaprolattone	pag 29
7. Colture cellulari: MC3T3-E1 e cellule staminali mesenchimali	pag 30
7.1 MC3T3-E1	pag 30
7.2 Cellule staminali mesenchimali (rMSC)	pag 30
8. Semina di cellule MC3T3-E1 e rMSC su scaffolds di PCL	pag 31
9. Valutazione dell'adesione, morfologia e crescita di popolazioni cellulari su PCL	pag 31
9.1 Morfologia e adesione cellulare	pag 31
9.2 Test di vitalità cellulare: MTS	pag 32

10. Valutazione del differenziamento osteogenico	
di popolazione cellulari su PCL	pag 33
10.1 Attività della fosfatasi alcalina (bALP)	pag 33
10.2 Saggio mineralizzazione in vitro	pag 34
10.3 Studio espressione marcatori osteogenici	pag 34
10.3.1 Estrazione mRNA	pag 35
10.3.2 Reazione di RT-PCR	pag 35
10.3.3 Elettroforesi su gel di agarosio	pag 36
11 Analisi dei dati	pag 36
RISULTATI	pag 37
1. Caratterizzazione scaffolds	pag 37
1.1 Analisi SEM e EDX	pag 37
1.2 Analisi MicroCT	pag 45
2. Riproduzione di falange umana realizzata con policaprolattone	pag 53
3. Colture cellulari	pag 54
4. Biocompatibilità degli scaffolds policaprolattone	pag 55
4.1 Vitalità cellulare	pag 55
4.2 Morfologia cellulare	pag 57
5. Attività osteogenica (studi di differenziamento su PCL)	pag 58
5.1 Attività della fosfatasi alcalina (ALP) in cellule MC3T3-E1	pag 58
5.2 Saggio di mineralizzazione in vitro in cellule MC3T3-E1	pag 60

5.3 RT-PCR di cellule MSC da midollo osseo di coniglio su PCL	pag 61
5.4 Attività della fosfatasi alcalina (ALP) in cellule MSC da midollo osseo	pag 64
5.5 Saggio di mineralizzazione in vitro in cellule MSC da midollo osseo	pag 66
DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	pag 68
BIOBLOGRAFIA	pag 74
RINGRAZIAMENTI	pag 86

RIASSUNTO

La rigenerazione ossea è proposta in ingegneria tissutale per il trattamento di diversi problemi ortopedici dovuti a molteplici cause. A partire dall'ultima decade, l'ingegneria tissutale provvede a fornire una valida alternativa per ovviare alle limitazioni terapeutiche e metodologiche che presentano il trapianto d'organo (autologo o eterologo) e la ricostruzione chirurgica. Grazie al rapido miglioramento delle conoscenze dei biomateriali, si è potuto creare degli scaffold polimerici, biocompatibili e biodegradabili i quali possono garantire un sostegno temporaneo all'osso danneggiato e favorire la rigenerazione di nuovo tessuto. La componente chiave dell'ingegneria tissutale ossea è lo scaffold, che serve da stampo per l'interazione con le cellule e la formazione della matrice extracellulare dell'osso, inoltre provvede a fornire un supporto per il nuovo tessuto in via di formazione.

Lo scaffold per la rigenerazione ossea deve rispondere a ben determinati criteri, come proprietà meccaniche simili al tessuto da riparare, biocompatibilità e biodegradabilità, e deve possedere un certo grado di rimodellamento. Per un biomateriale da utilizzare nella rigenerazione ossea inoltre è importante la porosità, la quale garantisce la migrazione e la proliferazione delle cellule e la vascolarizzazione del tessuto in via di formazione. Inoltre la porosità migliora l'interconnessione tra l'impianto e l'osso naturale, e provvede a garantire una grande stabilità meccanica in questa interfaccia critica.

Il policaprolattone (PCL) è un α -poliestere lineare, semicristallino approvato dalle Food and Drug Administration (FDA) per dispositivi da essere impiantati nel corpo umano. Esso viene degradato attraverso scissione idrolitica del legame estereo a pH fisiologico. Grazie alle sue proprietà di biocompatibilità, tasso di degradazione e di resistenza meccanica, è stato studiato come biomateriale per drug delivery e applicazione in ingegneria tissutale dell'osso. Lo scopo di questo lavoro è quello di ottenere uno scaffold di PCL realizzato attraverso la tecnica dell'inversione di fase usando un porogeno di dimensioni definite, in modo da ottenere una matrice con porosità, proprietà meccaniche e microstruttura tali da permettere l'adesione osteoblastica, la crescita e la differenziazione.

In questo lavoro sono state realizzate diversi scaffolds di PCL con vari porogeni (PEG, saccarosio, fruttosio, sfere e fili di alginato di calcio), inoltre per migliorare le proprietà meccaniche e la biocompatibilità, ma non influenzando sulla porosità, alle matrici polimeriche sono state aggiunte idrossiapatite

e una polvere d'osso naturale. Gli scaffold sono stati caratterizzati attraverso microscopia ottica a scansione e con microtomografia computerizzata (MicroCT).

La microscopia elettronica a scansione e l'analisi della porosità hanno indicato che gli scaffold realizzati con alginato di calcio (rapporto w/w rispetto al polimero 200/100) (**PCL-AT₂**) presentano indici morfometrici (porosità, interconnessione, distribuzione e dimensione pori) molto simili a quella dell'osso trabecolare naturale come anche PCL-AT₂ con l'aggiunta di idrossiapatite (**PCL-AT₂-HA**) o polvere d'osso (**PCL-AT₂-BP**). In parallelo l'analisi (MicroCT) ha confermato che gli scaffold preparati con i fili d'alginato di calcio presentano spazi vuoti interconnessi tra loro, che permettono la formazione di un ambiente biologico adatto all'adesione, crescita e differenziamento cellulare. Inoltre le prove meccaniche hanno evidenziato che tutte le matrici hanno una massima deformazione attorno ai 3 Kg. La bassa resistenza al carico in tutte le matrici, rispetto all'osso naturale, è riconducibile alla scarsa presenza della componente minerale (idrossiapatite) la quale permette di avere un materiale più resistente. Le matrici PCL-WP, PCL-AT₂ presentano un ricovero elastico abbastanza elevato, mentre si è riscontrato un valore basso per PCL-AT₂-HA, PCL-AT₂-BP, questo perché HA e BP rendono il polimero più rigido e meno elastico, cioè più simile all'osso naturale.

Il saggio di vitalità (MTS Assay) eseguito su due tipologie cellulari (MC3T3-E1 e cellule mesenchimali staminali da midollo osseo di coniglio) mostra che tutti e tre i tipi di scaffold, sopra indicati, presentano un microambiente adatto alla crescita cellulare rispetto al polimero senza l'aggiunta di porogeno **PCL-WP** da noi usato come riferimento. Infatti PCL-WP presenta una porosità di circa 21% mentre gli altri tra 72%-85%. Questo dato indica come una maggiore porosità influenzi positivamente l'adesione e la crescita cellulare in quanto garantisce migliore trasporto di nutrienti e di ossigeno. Inoltre avendo uno scaffold poroso, questo permette la migrazione delle cellule anche all'interno dello scaffold, colonizzando completamente la matrice, cosa non permessa dalla matrice PCL-WP in quanto più compatto.

L'analisi al microscopio a scansione ha evidenziato come le cellule dopo appena 24 h dalla semina siano completamente adese alla matrice e presentano una tipica forma allungata. A tempi più lunghi, 7-14 giorni si nota che le popolazioni cellulari hanno realizzato un monostrato completo, con difficoltà nel evidenziare i contorni cellulari di una singola cellula e con un inizio di deposito di matrice extracellulare.

I saggi per la valutazione dell'attività osteogenica in cellule MC3T3-E1 ha evidenziato come nei polimeri PCL-AT₂-HA e PCL-AT₂-BP ci sia una maggiore espressione di fosfatasi alcalina e una maggiore calcificazione della matrice rispetto a PCL-WP e PCL-AT₂ questo dato significa che la

presenza di fattori come idrossiapatite e polvere d'osso creano delle condizioni maggiormente favorevoli alle popolazioni cellulari affinché esse si differenzino in cellule dell'osso.

L'analisi di RT-PCR eseguita su cellule MSC seminate su PCL ha confermato l'avvenuto differenziamento in senso osteogenico, in quanto è stato osservato l'espressione di marcatori tipici come osteocalcina, RUNX-2, osteopontina, collagene I. In aggiunta anche in MSC si è riscontrato un profilo simile per quanto riguarda la produzione di fosfatasi alcalina e depositi di sali calcio, dove però si è osservato che le cellule MSC su PCL-AT₂-HA mantenute in condizioni basali di coltura esprimano un significativa differenza ($p < 0,05$) nella produzione di calcio rispetto a quelle seminate sugli altri scaffolds. dato è confermato anche a 14 e 21 giorni.

In conclusione possiamo dire di avere individuato un polimero adatto per la realizzazione di uno scaffold per la rigenerazione ossea, e individuato una metodica riproducibile, facile da eseguire ed economica, ottenendo scaffolds con indici morfometrici simili all'osso trabecolare naturale con utilizzo di alginato di calcio come porogeno, e capace di permettere l'adesione, la proliferazione e il differenziamento di preosteoblasti di linea e cellule mesenchimali staminali. L'aggiunta di HA e polvere d'osso agli scaffolds polimerici, non influisce sulla porosità ma garantisce maggiore rigidità, inoltre ottimizzano la potenzialità osteogenica delle matrici. Grazie alle caratteristiche della metodica di produzione, è stato possibile realizzare scaffolds con una forma di falange umana dimostrando che il metodo permette la possibilità di creare una protesi ossea su misura.

ABSTRACT

Bone regeneration in tissue engineering is proposed for the treatment of various orthopedic problems due to various causes. Since the last decade, tissue engineering to provide a viable alternative to compensate the therapeutic and methodological limitations that have the organ transplant (autograft or allograft) and surgical reconstruction. Due to the fast development on biomaterial technologies, to repair orthopedic defects scaffolds made by biocompatible and bioresorbable polymers and composite materials were developed for providing temporary support of damaged bone and sustain tissue regeneration. A key component in tissue engineering for bone regeneration is the scaffold that serves as a template for cell interactions and formation of bone extracellular matrix and to provide structural support for the new tissue. The scaffolds for bone regeneration should meet certain criteria, including mechanical properties similar to tissue repair, biocompatibility, biodegradability and possess a degree of remodelling. For a biomaterial used in bone regeneration is also important porosity, which promote the migration and proliferation of cells and the vascular tissue being formed. Furthermore, the porosity improves the interconnection between the natural system and bone, and shall ensure a high mechanical stability at this critical interface.

The polycaprolactone (PCL)- α is a linear polyester, semi-crystalline approved by the Food and Drug Administration (FDA) for devices to be implanted in the human body. It degrades through hydrolytic scission of ester bond at physiologic pH. Because of its biocompatibility properties, degradation rate and mechanical strength, it has been investigated as biomaterial for medical-drug delivery device, and load bearing bone tissue engineering applications. The aim of the present study was to obtain PCL scaffolds by means of phase separation technique using different porogen agents in order to achieve three-dimensional porous matrices with defined porosity, mechanical properties and microstructure which allow the osteoblastic adhesion, growth and differentiation.

In this work, we were carried out several scaffolds of PCL with various porogen (PEG, sucrose, fructose, spheres and threads of calcium alginate), also to improve the mechanical properties and biocompatibility, but with no effect on the porosity, we added hydroxyapatite and a natural bone powder.

The scanning electron microscopy analysis showed that the porosity of the scaffolds made of calcium alginate ratio (w/w porogen/polymer 200/100) (PCL-AT₂) had indices morphometric (porosity, interconnection, distribution and pore size) very similar to natural trabecular bone as well as PCL-AT₂ with the addition of hydroxyapatite (PCL-AT₂-HA) or bone powder (PCL-AT₂-BP).

In parallel, the microcomputed tomography (microCT) analysis confirmed the presence of interconnected void spaces suitable to allow the formation of a biological environment for cellular adhesion, growth and differentiation.

Moreover the mechanical test showed that all scaffolds have a maximum deformation around 3 Kg. The low load resistance, in all matrices in comparison to natural bone, is due of the lack of mineral component (hydroxyapatite), which provide a hard-wearing material. On the other hand, the elastic recovery of PCL-AT₂-HA, PCL-AT₂-BP was higher than that PCL-WP, PCL-AT₂, because the HA and BP make more rigid the polymer and less elastic, that is more like natural bone.

The viability assay (MTS assay) performed on two cell types (MC3T3-E1 cells and mesenchymal stem cells from bone marrow of rabbit) shows that all three types of scaffolds, as described above, have a microenvironment suitable for cell growth compared to the polymer without the addition of porogen PCL-WP we use as a reference. In fact, PCL-WP has a porosity of about 21% while the other matrices between 72% -85%. These data indicates, that greater porosity have a positive influence on adhesion and cell growth because to allow a better transport of nutrients and oxygen.

Scanning electron microscope analysis revealed that after 24 h of seeding the cells were adhered to the scaffolds and appeared flattened showing an irregular and elongated form. A 7-14 days can be seen that the cell populations have created a complete monolayer and started to ECM deposition

The activity of alkaline phosphatase and the mineralized matrix deposition PCL-AT₂-HA e PCL-AT₂-BP was higher than that PCL-WP e PCL-AT₂, this data means that the presence of factors such as hydroxyapatite and bone powder create the optimum conditions for osteogenic differentiation.

The RT-PCR analysis performed on MSCs seeded onto PCL confirmed the osteogenic differentiation as has been observe by the expression of typical markers, in addition MSC have a similar profile of alkaline phosphatase activity and deposition of calcium salts, where however, it was observed that the MSC on PCL-AT₂-HA under basal conditions, express a significant difference (p<0,05) of production of calcium compared with other scaffolds, this data was confirmed at 14 and 21 days.

In conclusion, we have identified a polymer suitable for the construction of a scaffold for bone regeneration, and identified a reproducible method, easy to implement and cheap, development of scaffolds with trabecular bone morphometric indexes similar nature with the use of calcium alginate as porogen which allow adhesion, proliferation and differentiation of preosteoblast cells line and mesenchymal stem cells. The addition of HA and bone powder to polymer scaffolds, does not affect on total porosity but provides greater rigidity and also improves the osteogenic potential of the matrices. Thanks to the characteristics of the method of production, it was possible to form scaffolds as a phalanx of human with the possibility to create a customized bone prosthesis.

INTRODUZIONE

1 Ingegneria tessutale ossea

L'osso è uno dei tessuti con una maggiore richiesta di rigenerazione, sostituzione o ricostruzione (Stylios et al., 2007). Ogni anno milioni di persone nel mondo sono soggette a lesioni a carico delle ossa, le quali possono essere causate da vari fattori: traumi, tumori, disfunzioni metaboliche, malformazioni congenite, osteoporosi (Ciapetti et al., 2003, Lin et al., 2003, Kneser et al., 2006). Questi danni al tessuto osseo possono essere trattati mediante ricostruzione chirurgica o attraverso il trapianto d'organo oppure, utilizzando l'ingegneria tessutale (Tabata 2009). Sebbene non ci siano dubbi, che le prime due terapie sopra citate abbiano salvato o migliorato innumerevoli vite, esse hanno alcune limitazioni terapeutiche e metodologiche.

Nel caso della ricostruzione chirurgica, le protesi sintetiche utilizzate non possono completamente sostituire le funzioni biologiche e conseguentemente non potranno prevenire il progressivo deterioramento della ferita o il danneggiamento del tessuto o dell'organo.

Tutti i vari tipi di trapianto d'organo (autotrapianto, allotrapianto, xenotrapianto) presentano delle limitazioni; nell'autotrapianto le possibilità di complicazioni sono pari al 30% e sono generalmente dovute ad una limitata disponibilità del tessuto osseo, alla morbidità del sito donatore, il dolore post operatorio, parestesia, prolungata ospedalizzazione e riabilitazione (Banwart et al., 1995, Chouzouri et al., 2007). I problemi legati all'alotrapianto sono dovuti alla scarsità di donatori, alla limitata vascolarizzazione, bassa cellularità, oltre ad un serio rischio di trasferimento di patogeni e una possibile risposta immunitaria (Nishida et al., 2008). Inoltre un altro problema dell'alotrapianto è il continuo utilizzo dei farmaci immunosoppressivi, i quali prevengono la reazione immunologica ma spesso causano l'insorgenza di altre problematiche come infezioni batteriche, virali e carcinogenesi (Tabata 2009).

Negli ultimi anni, l'ingegneria dei tessuti ha attratto l'interesse di molti ricercatori e chirurghi ortopedici con la speranza di trattare i pazienti attraverso interventi poco invasivi e meno dolorosi. L'ingegneria tessutale ha come scopo quello di rigenerare o sostituire tessuti od organi che per diversi motivi risultano essere danneggiati o mal funzionanti, e questa tecnica dovrebbe diventare una valida alternativa al classico trapianto d'organo. (Langer et al., 1993, Yang et al., 2001, Weinand

et al., 2006). L'ingegneria tissutale è una scienza interdisciplinare (biologia, ingegneria dei materiali, chimica, medicina), e può essere applicata a diversi tipi di organi e tessuti inclusi: pelle, intestino, fegato, sistema vascolare, muscolo, tessuto nervoso, esofago, valvole cardiache, cartilagine ed osso (Weigl et al.,2006). La base di questa tecnologia è che si parte da cellule provenienti dal paziente (stesso) con la patologia da curare, esse vengono isolate e successivamente fatte proliferare *in vitro* su un sistema tridimensionale (3D) o scaffold in presenza di fattori di differenziazione e di crescita in modo tale da realizzare un nuovo tessuto (Bonfield, 2006). Successivamente il costrutto o protesi realizzata in laboratorio verrà impiantata all'interno del difetto osseo (Mistry et al.,2005). Uno scaffold poroso è di fondamentale importanza in quanto esso dovrà inizialmente svolgere la funzione della matrice extracellulare (ECM), in modo tale da permettere l'iniziale adesione delle cellule e la successiva formazione del tessuto prima *in vitro* e in un secondo momento *in vivo*, favorire il differenziamento di cellule mesenchimali o precursori cellulari .(Shin et al.,2003).

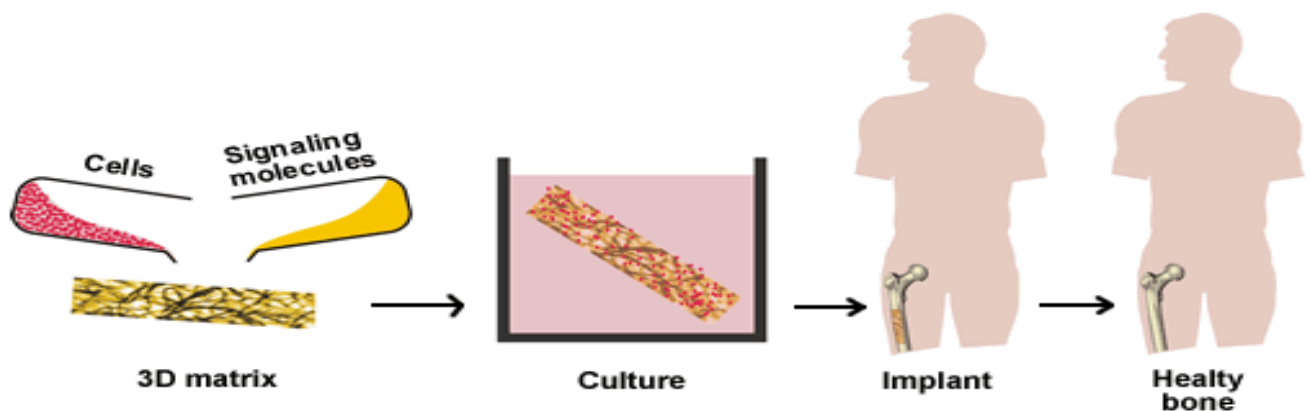


Figura 1: Ingegneria tissutale ossea

Gli scaffold utilizzati in applicazioni di ingegneria tissutale, devono possedere proprietà biologiche e fisiche adatte a soddisfare le condizioni fisiologiche *in vitro ed in vivo*. Altre proprietà strutturali e fisiche come l'interconnettività, la porosità e la morfologia della superficie, svolgono anch'esse un ruolo chiave in quanto influenzano l'adesione cellulare, il comportamento e lo sviluppo dei tessuti. In aggiunta per essere considerato appropriato per la rigenerazione ossea, uno scaffold deve soddisfare criteri di base, come le proprietà meccaniche simili a quelle dei siti di riparazione dell'osso, biocompatibilità, biodegradabilità, osteoconduttività (Burg et al., 2000, Hautmacher 2000, Salgado et al.,2004). Lo scaffold deve possedere una degradabilità controllabile in modo da

facilitare lo sviluppo dell'osso, produrre prodotti di degradazione non tossici, non provocare una risposta infiammatoria di tipo cronico, inoltre è fondamentale che sia facilmente sterilizzabile (Porter et al.,2009).

I concetti fondamentali che guidano lo sviluppo di scaffolds per l'ingegneria tessutale dell'osso, si basano sulla selezione del biomateriale e sul metodo di produzione, in quanto questi due fattori influiscono in modo significativo sulle proprietà del materiale (Spector et al., 2006). La natura del biomateriale è stata soggetta a notevoli studi, che hanno selezionato diversi materiali sia metallici, che ceramici,ma anche polimeri naturali e sintetici o materiali compositi.

2 Biomateriali per l'ingegneria tessutale ossea

2.1 Metalli e materiale ceramico

Negli anni passati per sostituire o riparare parti di tessuto osseo danneggiate, sono stati utilizzati metalli e ceramiche al fine di creare delle protesi artificiali di materiale inorganico. I principali metalli usati sono l'acciaio inossidabile, leghe a base di cobalto o di titanio (Brunski 1996) mentre tipiche ceramiche sono l'allumina, zirconia, fosfato di calcio e il bioglass (Hench 1996). Diversi studi hanno previsto l'utilizzo di protesi metalliche per curare difetti ossei su animali (Nishiguchi et al.,2001, van den Dolder et al.,2003), in quanto esse presentano ottime proprietà meccaniche (Karageorgiou et al.,2005). Tuttavia i metalli presentano diversi svantaggi come la mancanza di adesione da parte delle cellule del tessuto da riparare (Hulbert et al.,1970), e la bassa degradazione, inoltre potrebbe esserci la necessità di un secondo intervento per rimuovere l'impianto deteriorato e ripristinare una nuova protesi. Inoltre nel caso di una protesi permanente nel corpo potrebbe esserci un accumulo di ioni metallici a causa della corrosioni a cui è esposto l'impianto (Rubin et al.,1997).

I biomateriali in ceramica impiegati per l'osteogenesi sono principalmente basati su idrossiapatite o su materiali compositi. In generale questi biomateriali in ceramica sono in grado di formare un materiale simile all'apatite dell'osso, migliorando in questo modo la loro ossointegrazione. Questi biomateriali sono in grado di legare e concentrare citochine come nel caso dell'osso naturale (LeGeros, 2002). Gli svantaggi principali associati al loro uso sono la fragilità e la loro lenta degradazione (Karageorgiou et al.,2005).

A causa degli svantaggi associati all'uso di metalli e dei materiali in ceramica, negli ultimi anni l'attenzione della comunità scientifica e medica si è indirizzata verso i materiali polimerici

2.2 Polimeri naturali

Molti polimeri provenienti direttamente dalla natura, possiedono il grande vantaggio di essere biocompatibili e biodegradabili perché simili ai componenti strutturali di diversi tessuti (es. collagene e glicosamminoglicani). I polimeri naturali usati sono l'amido, il collagene, la chitina il chiosano i quali sono stati utilizzati per la riparazione di diversi tessuti compreso l'osso (Yang et al., 2001). Tuttavia la bassa resistenza meccanica e/o l'alta velocità di degradazione, porta a non usare questi biomateriali singolarmente ma in associazione con altri o dopo modifica delle loro proprietà chimiche attraverso *cross-linking* che migliora la resistenza meccanica ed aumenta il tempo di degradazione. Comunque le modificazioni chimiche possono comportare effetti tossici e diminuire la biocompatibilità del materiale (van Luyn et al., 1992). Per queste ragioni l'uso dei biopolimeri naturali come *scaffold* per ingegneria tessutale ossea è decisamente molto limitato.

2.3 Polimeri sintetici

I polimeri di origine sintetica possono avere struttura chimica molto varia grazie all'elevato numero dei monomeri di partenza attualmente disponibili. Inoltre si possono ottenere in varie forme, con diversi gradi di porosità globale, dimensione dei pori, velocità di degradazione e proprietà meccaniche.

Diverse classi di polimeri possono essere usate al fine di realizzare un scaffold come sostituto osseo, le più diffuse sono i poliesteri, polianidridi, poliortoesteri, polifosfazeni. Molti di questi polimeri sono degradati attraverso idrolisi chimica a pH fisiologico.

Una classe importante di polimeri di natura sintetica sono i poliesteri ed i copoliesteri dell'acido lattico e dell'acido glicolico i quali sono storicamente approvati dalla Food and Drug Administration (FDA).

Ad oggi molti poliesteri sono stati sperimentati come scaffold per la rigenerazione ossea, compreso l'acido poliglicolico (PGA), l'acido polilattico (PLA), i quali sono anche largamente usati anche in campo ospedaliero come ad esempio fili per suture chirurgiche. Inoltre sono usati anche il

poli(acido lattico-co-glicolico) (PLGA) e il poli(ϵ caprolattone) (PCL) (Kikuci et al.,1997, Marra et al.,1999, Stylios et al.,2007).

Tutti i polimeri dell'acido poliglicolico (PGA) possono essere ottenuti con un alto grado di cristallinità (40-75%), con una temperatura di transizione vetrosa che è compresa in un range che va da 25°C a 65°C e una temperatura di melting compresa tra 185°C e 225°C (Perrin et al.,1997, Middleton et al.,2000). A causa dell'alto grado di cristallinità, il PGA non è solubile in molti solventi organici ad eccezione di quelli altamente fluorurati come l'esafuoroisopropanolo (HFIP). Inoltre a causa della sua natura idrofilica, il PGA tende a perdere le proprietà meccaniche (~50%) in un periodo di circa 2 settimane e viene completamente assorbito in 4-6 mesi dopo l'impianto (Yang et al.,2001).

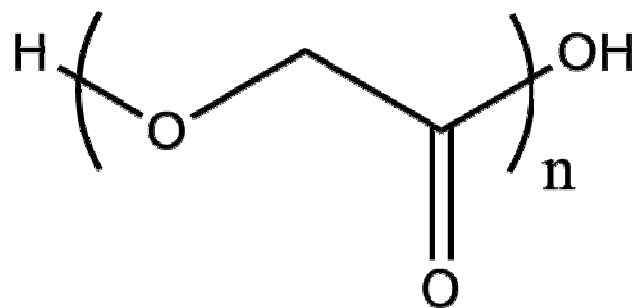


Figura 2: Acido poliglicolico (PGA)

L'acido polilattico (PLA) possiede una struttura molto simile al PGA, ma con caratteristiche chimiche, fisiche e meccaniche molto diverse a causa della presenza di un gruppo metilico sul carbonio α .

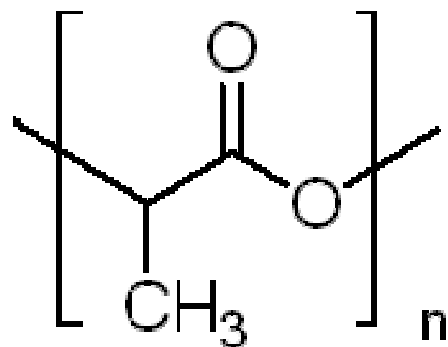


Figura 3: Acido polilattico (PLA)

A causa di questa struttura, il carbonio α risulta essere chirale, così il PLA presenta tre isomeri D,L,DL. L'isomero poli (L-lattico) (PLLA) è semicristallino e relativamente rigido, mentre il poli (D;L lattico) (PDLLA) è un materiale amorfo e trasparente. Il grado di degradazione di PDLLA risulta essere più rapido rispetto a PLLA. A seconda delle dimensioni e dello spessore dell'impianto la degradazione dei campioni può avvenire in un periodo di circa 2-12 mesi.

La rapida degradazione dei polimeri sopra descritti, porta anche ad un cambiamento delle proprietà meccaniche, le quali sono indispensabili per la realizzazione di un scaffold adatto alla ingegneria tessutale ossea. Le proprietà meccaniche relativamente povere di PGA e PLA e relativi copolimeri, ne limitano il loro utilizzo come scaffolds ossei. Inoltre la rapida degradazione idrolitica comporta il rilascio di monomeri acidi (ac.glicolico, ac.lattico) che riducono il pH locale e quindi inducono una risposta infiammatoria locale (Pitt et al., 1990, Ceonzo et al., 2006).

Dopo impianto di protesi di policaprolattone *in vivo*, è stato osservato che le proprietà meccaniche del polimero rimangono invariate per circa 5-6 mesi (Lahm et al.,2009) e la completa degradazione avviene dopo un periodo di 2 anni (Zein et al.2002), il che permette la creazione di un substrato con sufficienti proprietà meccaniche in grado di garantire la funzione di supporto fino alla completa degradazione, quando il tessuto osseo sarà già totalmente formato.

I test di degradazione *in vivo* hanno evidenziato come il polimero sia degradato in due fasi distinte: inizialmente avviene una diminuzione del peso molecolare (PM) senza che ci sia deformazione e diminuzione della massa e, successivamente, quando il PM arriva fino al valore di 5000 dalton, il materiale si rompe, perde la sua consistenza e lentamente viene assorbito ed eliminato dall'organismo (Pitt et al., 1991). Frammenti di PCL con basso peso molecolare possono essere degradati da parte delle cellule, infatti frammenti di polimero sono ingeriti e digeriti dai fagociti e dai macrofagi (Pitt et al., 1991), dunque si può concludere che nella seconda fase di degradazione sia interessata la fagocitosi intracellulare.

La bassa cinetica di degradazione riduce il rischio di acidosi dovuto al rapido accumulo di residui acidi come nel caso di PLA e PGA (Pitt et al.,1991).

3 Porosità

Come già scritto in precedenza, lo scaffold per la rigenerazione ossea deve soddisfare alcuni criteri, quali proprietà meccaniche simili all'osso da riparare, oltre a biocompatibilità e biodegradabilità, possedere un buon grado di rimodellamento e avere una buona porosità (Karageorgiou et al.,2005). In aggiunta lo scaffold è fondamentale per garantire l'osteconduttività, e funzionare come delivery per diverse citochine utili all'osteconduzione, come bone morphogenic protein (BMPs), l'insulin-like growth factors (IGFs), e transforming growth factors (TGFs) (Groeneveld et al.,1999).

La matrice polimerica dovrebbe mimare la morfologia dell'osso, la struttura e le funzioni in modo da ottimizzare l'integrazione nel tessuto circostante. L'osso è composto da cristalli di idrossiapatite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6^{++}$ i quali sono localizzati all'interno di una matrice organica. La particolare morfologia creata dalla struttura dell'osso trabecolare, forma un ambiente poroso con una porosità compresa tra 50-90% (Kaplan et al.,1994), mentre i pori presentano un diametro medio di 1 mm (Keaveny et al.,2001).

Al fine di creare una protesi polimerica il più simile possibile all'osso naturale è indispensabile che essa, possieda una struttura altamente porosa e che questi pori siano tra di loro interconnessi.

La porosità è definita come la percentuale di spazi vuoti in un solido (Leon, 1998) ed è una proprietà morfologica indipendente dal materiale (Kuboki et al.,1998).

I pori sono necessari per la formazione del tessuto osseo in quanto permettono la migrazione e la proliferazione di osteoblasti o cellule mesenchimali così come la vascolarizzazione. La superficie porosa migliora la meccanica tra il biomateriale e l'osso naturale provvedendo ad aumentare la stabilità meccanica in questa interfaccia critica (Story et al., 1998). Il minimo di grandezza dei pori per generare mineralizzazione ossea in vivo è di circa 100 μm (Hulbert et al., 1970) e con una porosità totale compresa tra 80-90% (Freed et al., 1994). Con pori larghi (100-150 μm e 150-200 μm) è stato visto che c'è una sostanziale crescita di tessuto osseo, mentre con pori piccoli (10-75 μm) non c'è mineralizzazione dell'osso ma solo penetrazione di tessuto fibroso.

La necessità della porosità nella rigenerazione ossea, è stata dimostrata dallo studio di Kuboki et al., il quale usando due modelli sperimentali, uno formato da un scaffold solido e poco poroso e un altro da uno scaffold poroso di idrossiapatite per il rilascio di BMP-2, osservò come non si formò nuovo tessuto osseo dove era stato utilizzato lo scaffold poco poroso, mentre nello scaffold con idrossiapatite e con una elevata porosità si verificò l'osteogenesi.

La macroporosità (pori > 50 μm) ha un forte impatto sull'osteogenicità dello scaffold, in quanto permette la migrazione delle cellule all'interno dello scaffold in modo tale da avere una completa colonizzazione del biomateriale. Allo stesso modo anche la microporosità (pori < 10 μm) è di fondamentale importanza per ottenere un buon scaffold. Infatti la microporosità sembra favorire l'adsorbimento di proteine che inducono al differenziamento osseo, oltre che permettere gli scambi ionici e permettere la formazione di ECM (Yuan et al., 1999).

Diversi studi hanno evidenziato come l'alta porosità dello scaffold permette un miglioramento dell'osteogenesi, in quanto si verifica una maggiore proliferazione ed una migliore vascolarizzazione con conseguente maggiore apporto di nutrienti e di ossigeno (Takahashi et al., 2004). Un aspetto molto interessante da osservare è l'impatto che la grandezza dei pori ha sulla progressione dell'osteogenesi. Si è osservato che su scaffolds con pori piccoli (<120 μm) impiantati su ratti avviene prima la condrogenesi e in un secondo momento l'osteogenesi, mentre su scaffolds con pori grandi (>350 μm) l'osso si sviluppa direttamente (Jin et al., 2000, Kuboki et al., 2002). La migliore vascolarizzazione che è stata osservata nelle matrici con pori grandi, ha garantito una maggiore tensione di ossigeno e più nutrienti, condizioni favorevoli allo sviluppo diretto dell'osteogenesi.

Sebbene l'incremento di porosità e della grandezza dei pori faciliti lo sviluppo di nuovo tessuto osseo, esso porta ad una drastica riduzione delle proprietà meccaniche con conseguente

compromissione dell'integrità strutturale dello scaffold. Dunque è necessario ottenere un compromesso tra porosità e proprietà meccaniche dello scaffold, in modo da garantire sia la stabilità che l'osteogenicità.

4 Tecniche di produzione di scaffolds per la rigenerazione ossea

La metodica di produzione dello scaffold influisce in modo notevole sulla porosità e di conseguenza sulle caratteristiche fisiche e meccaniche. Gli scaffolds possono essere prodotti utilizzando diverse tecniche, alcune sono adatte per diversi polimeri altre invece solo per un particolare tipo, comunque nessuna metodica può essere considerata come ideale. Perciò è indispensabile scegliere la tecnica più adatta in base al polimero che si vuole utilizzare. Le tecniche convenzionali includono: solvent casting, particulate leaching, fiber bonding, inversione di fase, gas foaming, electrospinnig, supercritical fluid-gassing.

La metodica del solvent casting in combinazione con il particulate leaching prevede l'uso di un porogeno, solubile in ambiente acquoso come ad esempio cloruro di sodio, saccarosio, citrato, tartrato. Lo scaffold che si ottiene presenta una porosità che può essere controllata in base alla quantità di porogeno aggiunta, mentre la grandezza dei pori dipende dalle dimensioni dei cristalli di sale (Mikos et al.,1993b, Mikos et al., 1994), con questa metodica i pori esibiscono una elevata interconnettività. Dall'altra parte, si ottengono delle membrane con spessori eccessivamente sottili (pochi μm), il che rende impossibile realizzare scaffold 3D per la rigenerazione ossea (Hutmacher 2000). Un altro svantaggio di tale tecnica è l'eccessivo utilizzo di solventi organici i quali richiedono tempi molto lunghi per l'eliminazione (giorni o settimane).

La tecnica fiber bonding, è basata sull'utilizzo di un network di fibre polimeriche interconnesse tra di loro (Mikos et al.,1993.). Tale procedura porta a produrre matrici con porosità molto elevata ma non controllabile (Mooney et al., 1996b), e comporta l'uso di solventi organici che potrebbero risultare tossici per le future colture cellulari, in quanto non rimossi completamente.

Utilizzando il sistema gas foaming, non è previsto l'uso di solventi tossici, infatti in sostituzione di quest'ultimi vengono usati degli schiumogeni a gas per ottenere matrici porose (Mooney et al., 1996b). Si ottiene una porosità superiore al 93% e con diametro medio dei pori di 100 μm ma questi pori sono largamente non connessi tra di loro, in modo particolare a livello superficiale.

La tecnica dell'electrospinnig permette di ottenere scaffold costituiti da fibre polimeriche di

dimensioni nanometriche ed è proposto per la realizzazione di alcuni dispositivi biomedicali. Si ottiene applicando un alto voltaggio ad una soluzione polimerica fatta fluire in un ago di siringa. La differenza di potenziale applicata permette la fuoriuscita del solvente e la deposizione della fibra polimerica (Chen et al., 2007). Si possono ottenere fibre di spessori diversi variando il diametro dell'ago. Anche per l'electrospinnig non è possibile ottenere delle matrici 3D con uno spessore di alcuni μm , il che non rende adatta tale tecnica per la realizzazione di protesi ossee.

Il metodo del supercritical fluid-gassing è conosciuto da molti anni nell'industria polimerica non medica e dalla comunità farmaceutica. Con questo metodo si possono produrre delle matrici molto porose, però i polimeri usati devono necessariamente possedere un'alta frazione amorfa nella loro struttura, questo porta ad escludere tutti i polimeri altamente cristallini. Inoltre la matrice che si ottiene presenta pochi pori interconnessi (10-30%) (Hutmacher 2000).

La metodica dell'inversione di fase è una tecnica spesso usata per la realizzazione di matrici polimeriche con una discreta porosità (75-80%) e con pori di discrete dimensioni (100 μm). Questo metodo prevede due variabili: l'emulsione/liofilizzazione e la separazione della fase liquido-liquido (Mikos et al., 2000, Hua et al., 2002, Shin et al., 2005.). Il polimero viene disciolto in un solvente organico, una volta solubilizzato, si procede all'aggiunta di acqua distillata in modo tale da ottenere un'emulsione. Il polimero tende a precipitare sotto forma di gel, a causa dell'entrata del non solvente (H_2O) e la contemporanea uscita del solvente organico. Il gel è prelevato, messo in uno stampo e posto a -30°C per la completa solidificazione. Questa tecnica è caratterizzata da un'elevata flessibilità e potrebbe essere interessante il suo uso per ottenere scaffolds per l'ingegneria tissutale dell'osso. I diversi parametri possono essere modificati per personalizzare la dimensione dei pori e la porosità, inoltre ottenendo un gel è possibile ottenere una protesi di qualsiasi forma. L'inversione di fase è facile da realizzare, economicamente conveniente rispetto ad altre tecniche di produzione. Un aspetto negativo di tale tecnica è la possibile presenza di residuo di solvente organico.

5 Modelli cellulari

Negli ultimi decenni sono stati fatti progressi notevoli nella comprensione dell'osteogenesi grazie a studi che hanno previsto l'utilizzo *in vitro* di preostoblasti di linea o cellule staminali mesenchimali estratte da vari fonti (midollo osseo, tessuto adiposo, sangue periferico). Successivamente tali

popolazioni cellulari sono state differenziate mediante l'uso di terreni di coltura selettivi, e successivamente sono state identificati i geni implicati in tale differenziamento.

5.1 Linee cellulari preosteoblastiche

Sono disponibili molte linee cellulari per studiare i meccanismi biologici implicati nel differenziamento osteogenico. Le più utilizzate sono riportate nella seguente tabella riassuntiva:

Linea cellulare	Origine	Caratteristiche
C3H10T1/2 clone 8	Embrione topo	Cellule pluripotenti che differenziano in osteoblasti, condrociti, miotubi, adipociti.
ROB-C26	Osso calvaria ratto	Precursori osteoblastici che differenziano solo in miotubi e adipociti.
MC3T3-E1	Osso calvaria embrionale topo	Cellule differenziabili solo in osteoblasti.
C2C12	Subclone derivato da mioblasti C2 di topo	Cellule mioceniche che se trattate con BMPs possono differenziarsi in osteoblasti
Saos-2	Sarcoma primario umano	Cellule che differenziano solo in osteoblasti

Tabella 1: Modelli cellulari in vitro per la differenziazione osteogenica

Il gruppo di lavoro di Kodama et al., nel 1981 ha isolato otto linee cellulari prelevate dall'osso calvaria di embrione di topo. Da una linea delle otto di partenza è stato selezionato un clone il quale è stato denominato MC3T3-E1. Questa linea clonale presenta una attività della fosfatasi alcalina molto bassa quando le cellule sono nella fase di proliferazione, ma tale enzima aumenta di qualche centinaio di volte la propria attività quando le cellule raggiungono la massima confluenza o sono

soggette a stimoli osteogenici. Le cellule inoltre producono abbondante sostanza fibrosa intracellulare. In aggiunta le popolazioni cellulari rispondono positivamente alla colorazione di Alizarin Red S, dopo 30 giorni di coltura. Tali osservazione suggeriscono che cellule MC3T3-E1 sono una linea cellulare con la capacità di differenziarsi in osteoblasti e di depositare matrice mineralizzata *in vitro*.

5.2 Cellule staminali mesenchimali

Le cellule staminali sono cellule con delle caratteristiche peculiari, quali essere indifferenziate, capaci di autoregenerarsi (self-renewal), capaci di differenziarsi in tipi cellulari differenti, capaci di ripopolare un dato tessuto *in vivo*. Si possono suddividere in staminali embrionali e staminali adulte. Un particolare tipo di staminali adulte sono le cellule staminali mesenchimali (MSCs) le quali sono cellule pluripotenti residenti nel midollo osseo, in grado di differenziare in cellule del tessuto adiposo, del tessuto cartilagineo, del tessuto osseo, nello stroma che supporta l'ematopoiesi, tessuto muscolare (Dong et al., 2009). Le cellule MSCs isolate, comunque rappresentano una miscela eterogenea di cellule con variazioni nella capacità proliferativa e differenziativa. Al fine di ottenere una popolazione omogenea di MSCs è opportuno verificarne l'immunofenotipo, attraverso la presenza di alcune specifiche proteine di superficie (Stro-1, CD13, CD29, CD44, CD73, CD105, CD106), mentre alcune proteine non dovrebbero essere presenti (CD11b, CD31, CD34, CD45, CD117) (Kolf et al., 2007). Queste cellule contribuiscono al mantenimento e alla rigenerazione di un tessuto adulto dopo che esso ha subito un danno. Le MSCs da midollo osseo sono cellule facilmente ottenibili e espandibili *in vitro*, inoltre comparate con altre colture primarie come ad esempio gli osteoblasti ottenuti dal periostio presentano notevoli vantaggi. MSCs sono facilmente manipolabili, la loro estrazione comporta un danno inferiore e possiedono una bassa immunogenicità. Inoltre esse possono riflettere meglio il contesto *in vivo* rispetto alle cellule di linea in quanto sono diploidi anziché aneuploidi.

Le cellule mesenchimali sono state impiegate in diversi studi per la rigenerazione ossea al fine di riparare difetti a ossa lunghe, alveoli dentali, e ossa del cranio (De Kork et al., 2003, Tsuchida et al., 2003).

6 Microtomografia computerizzata (MicroCT)

La determinazione delle caratteristiche strutturali di un biomateriale, le quali possono influenzare la crescita di nuovo tessuto osseo, è di fondamentale importanza, e per raggiungere questo scopo è necessario avere tutte le informazioni possibili sulla struttura tridimensionale (3D) dello scaffold. Un gran numero di campioni istologici per tipologia di scaffold sono richiesti per una accurata determinazione delle caratteristiche 3D, ma questo lavoro è altamente laborioso e estremamente difficile. Per questa ragione si è cercato una fonte alternativa all'analisi istologica come ad esempio la microtomografia computerizzata (Micro CT). Anche se non può fornire tutti i dati di una analisi istologica standard, la Micro CT può dare notevoli vantaggi per la valutazione morfologica. Infatti la Micro CT può fornire dati in modo rapido e non distruttivo, sulla struttura tridimensionale del biomateriale o di un costrutto biologico (Jones et al.,2004, Porter et al.,2005).

La tomografia computerizzata è una tecnica radiodiagnostica che consente l'acquisizione di un'immagine corrispondente ad una sottile sezione assiale di un oggetto, tramite l'elaborazione mediante un calcolatore dei valori densitometrici, ricavati dai coefficienti d'assorbimento, di un fascio di raggi X da parte delle strutture attraversate. La microtomografia è sostanzialmente una miniaturizzazione della tomografia computerizzata tradizionale, usata per creare mappe 2D e 3D di attenuazione di campioni con dimensioni di pochi millimetri e una risoluzione dell'ordine di qualche micrometro.

Gli elementi che compongono una sistema microtomografico sono: la sorgente radiogena, il sistema di movimento del campione, il sistema di rilevazione.

Qualsiasi immagine ottenuta con un fascio di X-ray corrisponde alla proiezione bidimensionale di un oggetto tridimensionale. La microtomografia computerizzata fonda il suo funzionamento sull'utilizzo di un tubo radiogeno, generatore di raggi X, e un rivelatore di radiazione. La sorgente di raggi X emette un fascio di radiazione incidente che, investendo la materia viene più o meno assorbita da questa attraverso i processi di assorbimento dei raggi X, (effetto fotoelettrico e effetto Compton). Quando la radiazione monocromatica penetra nel mezzo assorbente, dà luogo a radiazioni fotoniche diffuse secondarie e con minore energia; dunque quando emerge da esso si è in presenza di una radiazione policromatica, meno dura della radiazione monocromatica incidente. Essendo policromatica è bene che essa sia opportunamente filtrata con un filtro passa-banda in modo da ottenere una radiazione monocromatica. In questo modo si riduce il problema

dell'indurimento del fascio e si migliora notevolmente la sensibilità della MicroCT alle più piccole variazioni di assorbimento di raggi X all'interno del campione.

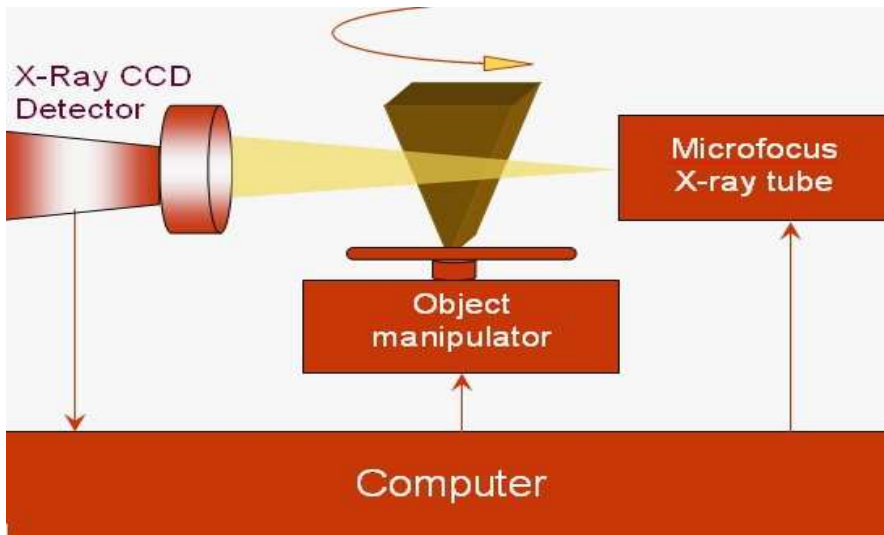


Figura 5: Schema funzionamento MicroCT

La radiazione che emerge dal campione colpisce un rivelatore di radiazione di tipo *Charged Coupled Device* (CCD) che una volta raccolti i dati li trasferisce ad un opportuno calcolatore.

Con l'utilizzo della tecnica microtomografica è possibile ottenere l'analisi densitometrica e volumetrica del campione in esame, oltre che l'immagine tridimensionale della sua struttura interna senza che questo venga in alcun modo trattato o danneggiato.

SCOPO DELLA TESI

L'obbiettivo di questo lavoro è stato quello di riuscire a sviluppare delle bioprotesi tridimensionali, *in vitro*, adatte alla rigenerazione ossea. Al fine di raggiungere tale obbiettivo sono stati realizzati degli scaffolds di policaprolattone, utilizzando come tecnica di produzione l'inversione di fase.

Inoltre, come descritto in letteratura, gli scaffolds da utilizzare per rigenerare il tessuto, devono essere molto porosi e con pori interconnessi tra di loro in modo da garantire la proliferazione e la migrazione cellulare, oltre che l'apporto di nutrienti e di ossigeno. Per aumentare la porosità, sono stati utilizzati in questo studio differenti tipi di porogeni (polietilenglicole, saccarosio, fruttosio, alginato di calcio). La morfologia è stata determinata attraverso microscopia ottica a scansione, mentre la struttura tridimensionale, porosità e le caratteristiche meccaniche con la microtomografia computerizzata.

Sono stati eseguiti gli studi biologici mediante l'uso di cellule: MC3T3-E1 preosteoblasti di topo, e cellule staminali mesenchimali estratte da midollo osseo di coniglio (rMSC).

Su i costrutti realizzati sono stati eseguiti studi di morfologia e adesione cellulare, saggi di vitalità mentre il differenziamento osteogenico è stato analizzato attraverso la valutazione dell'espressione di fosfatasi alcalina e la mineralizzazione della matrice extracellulare. Infine è stato svolto uno studio di espressione genica di tipici marcatori osteogenici attraverso RT-PCR.

MATERIALI E METODI

1 Preparazione dello scaffold polimerico

Sono state realizzate 5 tipologie di scaffolds attraverso la tecnica dell'inversione di fase utilizzando come polimero il policaprolattone (PCL) (*Sigma-Aldrich*) e diversi porogeni in modo tale da aumentare la porosità del polimero.

1.1 PCL senza porogeno (PCL-WP)

Il policaprolattone ($M_w \sim 65$ KDa, densità 1.145) (17.5% w/w) è stato solubilizzato in tetraidrofurano (*Sigma-Aldrich*) (THF) a temperatura ambiente per due ore sotto costante agitazione. Dopo completa solubilizzazione, alla soluzione polimerica è stata aggiunta acqua distillata (50% del peso della soluzione) sempre in agitazione, fino ad ottenere due fasi distinte (acqua e gel). La fase acquosa viene eliminata e il gel ottenuto trasferito in un stampo di acciaio a forma di parallelepipedo e posto in congelatore a -30°C per 24 ore fino a completa solidificazione. Successivamente lo scaffold ottenuto, è stato estratto dallo stampo, sottoposto ad una serie di 3 lavaggi con alcool etilico (*Sigma-Aldrich*) a -30°C per 24 ore, seguiti da due risciacqui con acqua distillata, per rimuovere completamente le tracce del solvente. Lo scaffold, tramite l'utilizzo di un bisturi è stato tagliato in dischi (1 cm diametro e 1mm di spessore) che sono stati conservati in acqua a 4°C sino al loro utilizzo.

1.2 PCL con Polietilenglicole (PCL-PEG)

Il polietilenglicole 1000 (PEG-1000) (*Sigma Aldrich*), viene solubilizzato nel solvente THF insieme al PCL (17.5% w/w). Sono stati realizzati tre tipi di scaffolds, aggiungendo il PEG 1000 in quantità diverse (15%, 30%, 100%) rispetto alla quantità di polimero. In seguito, è stata aggiunta alla soluzione polimerica, H₂O distillata (50% rispetto al peso della soluzione). Il gel ottenuto viene

posto in uno stampo e incubato a -30°C per 24 ore fino a completa solidificazione. Successivamente PEG-1000 e solvente erano rimossi attraverso lavaggi con etanolo freddo a -30°C e con acqua.

1.3 PCL con saccarosio (PCL-S)

Il saccarosio (*Carlo Erba*) è stato utilizzato macinato attraverso un mulino poi setacciato e selezionato tre formati di particelle di diverse dimensioni (50-140 μm , 140-180 μm , 180-400 μm). In aggiunta sono state realizzate matrici di PCL con saccarosio non micronizzato con un diametro variabile delle particelle (180-600 μm). Si è ottenuto un gel di PCL con la stessa procedura descritta precedentemente e ad esso è stato aggiunto il saccarosio con vari rapporti tra polimero e porogeno, mantenendo la soluzione sotto agitazione. Le particelle con diametro (50-140 μm , 140-180 μm , 180-400 μm) sono state aggiunte alla soluzione nel rapporto 15/100 (PCL-S₁), mentre particelle con diametro (180-600 μm) nel rapporto 15/100, 30/100, 100/100 (PCL-S₂). Il gel con il porogeno incorporato è stato trasferito in uno stampo e incubato a -30°C per 24 ore fino a completa solidificazione. Successivamente saccarosio e solvente erano rimossi attraverso lavaggi con etanolo freddo a -30°C e con acqua.

1.4 PCL con sfere di fruttosio (PCL-F)

Le sfere di fruttosio sono state prodotte con la tecnica dell'emulsione (Wei et al.,2006). Il fruttosio (*Sigma-Aldrich*) (20g), è stato sciolto a 120°C per 90 minuti fino a completa liquefazione. Al fine di ottenere un'emulsione, si è aggiunto olio minerale (*Sigma-Aldrich*) (20 ml) e Span 80 (*Sigma-Aldrich*) (0.52 ml) tutto sotto agitazione a temperatura ambiente. La risultante miscela è stata raffreddata in bagno di ghiaccio per permettere la formazione delle sfere di fruttosio. Dopo rimozione dell'olio minerale, le sfere ottenute sono state lavate con n-esano (*Sigma-Aldrich*), riscaldate a 37°C per 30 minuti in modo tale da compattare le sfere ed eliminare i residui di esano, seccate sotto vuoto ed in fine setacciate per selezionare particelle con un diametro compreso tra 150 e 400 μm .

Al gel di PCL, sono state aggiunte le sfere di fruttosio usando il seguente rapporto in peso di fruttosio/PCL: 25/100, 50/100, 100/100. Il gel era posto in uno stampo e -30°C per 24 ore fino a completa solidificazione. Solvente e fruttosio erano rimossi come precedentemente descritto.

1.5 PCL con sfere di alginato di calcio e PCL con fili di alginato di calcio

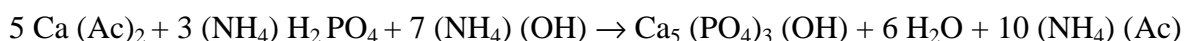
Alginato di sodio (*Sigma-Aldrich*) (0.9% w/v) è stato solubilizzato in acqua sotto costante agitazione per 24 ore a temperatura ambiente (Smidsrød et al.,1990).

Le sfere di alginato di calcio sono state ottenute facendo gocciolare la soluzione di alginato di sodio in una soluzione di cloruro di calcio (CaCl_2) (*Sigma-Aldrich*) (50mM) usando una siringa con un ago del diametro di 800 μm . I fili di alginato di calcio invece sono stati realizzati immergendo completamente l'ago della siringa nella soluzione di CaCl_2 .

Con le sfere di alginato di calcio sono stati realizzati due scaffolds con i seguenti rapporti in peso tra porogeno e PCL: (50/100, 100/100) (PCL-AS), mentre con i fili di alginato di calcio abbiamo ottenuto due scaffolds con il seguente rapporto porogeno e PCL :(100/100, 200/100) (PCL-AT₁, PCL-AT₂). Il gel di PCL era aggiunto direttamente al porogeno, il quale era precedentemente posto all'interno dello stampo. Il gel è stato poi trasferito a -30°C per 24 ore fino a completa solidificazione. Il THF era rimosso attraverso i lavaggi descritti in precedenza, mentre sia le sfere che i fili di alginato di calcio sono stati eliminati con lavaggi in una soluzione di fosfato di sodio (*Sigma-Aldrich*) (0.1 M, pH 7.0) e poi con acqua. I campioni PCL-AT₁, PCL-AT₂ sono stati utilizzati per gli studi biologici con cellule. Per questo motivo dallo scaffold iniziale sono stati ottenuti dei dischi come descritto per PCL-WP.

2 Preparazione di idrossiapatite

La polvere di idrossiapatite (HA) è stata sintetizzata per via umida attraverso il metodo della precipitazione. Ad una soluzione acquosa di acetato di calcio $\text{Ca}(\text{Ac})_2$ (*Sigma Aldrich*) (1M) è stata aggiunta, goccia a goccia, una soluzione di fosfato di ammonio $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (*Sigma Aldrich*) (1M). La reazione è:



Il pH della soluzione finale è stato mantenuto a 10 utilizzando una soluzione di ammoniaca 33% (*Sigma Aldrich*). La miscela è stata mantenuta in agitazione per 24 ore e successivamente portata a 70°C per 20 ore sempre sotto costante agitazione. Al termine della procedura si è ottenuto un precipitato il quale è stato filtrato, lavato con acqua e infine essiccato sotto vuoto per una notte.

3 Preparazione della polvere d'osso

I femori di ratti Sprague Dawley dopo essere stati puliti dai residui di tessuto, sono stati raffreddati con azoto liquido e poi polverizzati in mulino. La polvere ottenuta è stata demineralizzata attraverso una incubazione con acido cloridrico HCl (*Sigma Aldrich*) 0.5 M (25meq/g) per 2 ore a 4°C, seguita da una centrifugazione per 4 minuti a 4000 rpm a 4°C. Successivamente è stata eseguita la completa decellularizzazione della polvere utilizzando un metodo detergente-enzimatico (Meezan et al.,1975). Tale metodo prevede uno step in cui la polvere d'osso viene trattata con H₂O per 72 ore a 4°C. Dopo centrifugazione, il pellet viene trattato con una soluzione di sodio deossicolato (*Sigma Aldrich*) sotto agitazione per 4 ore. Si esegue un' ulteriore centrifugazione, e al pellet viene aggiunta una soluzione a 2000 KU DNase I (*Sigma Aldrich*) in 1 M NaCl (*Sigma Aldrich*) per 2 ore. La polvere ottenuta viene mantenuta a 4°C sino al momento dell'uso.

4 PCL-AT₂ con idrossiapatite o con polvere d'osso

Al fine di migliorare l'adesione, la proliferazione, e il differenziamento osteogenico sono stati realizzati scaffolds PCL-AT₂, addizionati con idrossiapatite (PCL- AT₂-HA) o con polvere d'osso (PCL-AT₂-BP).

Per la preparazione dello scaffold PCL-AT₂ è stato aggiunto il 25% di idrossiapatite rispetto al peso di PCL, e il 13.3% di polvere sempre rispetto al polimero.

I due componenti sono stati aggiunti nella fase gel, prima di procedere con il congelamento per la solidificazione degli scaffolds. I campioni PCL-AT₂-HA, PCL-AT₂-BP sono stati utilizzati per gli studi biologici con cellule. Per questo motivo dallo scaffold iniziale sono stati ottenuti dei dischi come descritto per PCL-WP.

Scaffold	Porogeno	Porogeno:PCL (w/w)
PCL-WP	Non presente	0
PCL-P	PEG-1000	15:100; 30:100; 100:100
PCL-S₁	Saccarosio (range 50-140 e 140-180 µm)	15:100
PCL-S₂	Saccarosio (range 180-600 µm)	15:100; 30:100; 100:100
PCL-F	Sfere di fruttosio (diametro 150-400 µm)	25:100; 50:100; 100:100
PCL-AS	Sfere di alginato di calcio (diametro 1500 µm)	50:100; 100:100
PCL-AT₁	Fili di calcio alginato (diametro 1000-1500 µm)	100:100
PCL-AT₂	Fili di calcio alginato (diametro 1000-1500 µm)	200:100
PCL-AT₂-HA	Fili di calcio alginato (diametro 1000-1500 µm) + 25% idrossiapatite	200:100
PCL- AT₂-BP	Fili di calcio alginato (diametro 1000-1500 µm) + 13,3% di polvere d'osso	200:100

Tabella 2: Differenti scaffolds di PCL ottenuti con la metodica dell'inversione di fase

5 Caratterizzazione strutturale degli scaffold di PCL

L'assenza di residui di THF all'interno degli scaffold è stata verificata analizzando le soluzioni di lavaggio attraverso gas cromatografia-spettroscopia di massa (*Varian 3800 gas chromatograph and Varian Saturn 2000 ion trap mass detector*). Il diossano è stato usato come standard interno.

L'analisi morfologica e della grandezza dei pori è stata eseguita attraverso la microscopia elettronica a scansione (SEM) (*Stereoscan-205 S; Cambridge Instruments, Cambridge, MA*). Il campione è stato liofilizzato, congelato con azoto liquido, fratturato rivestito di uno strato di oro per rendere conduttivo il campione ed aumentare il contrasto topografico (fornendo elettroni secondari); il metallo, inoltre, stabilizza strutture delicate contro il riscaldamento prodotto dal fascio elettronico, e osservato al microscopio elettronico. La porosità dei campioni è stata valutata attraverso due differenti metodiche: metodo della densità e mediante la microtomografia computerizzata.

Nel primo metodo, la porosità totale è stata valutata applicando la seguente equazione:

$$\Phi = V_0/V_1$$

Dove Φ è la porosità totale, V_1 è il volume dello scaffold misurato geometricamente e V_0 è la differenza tra V_1 e il volume calcolato dividendo il peso dello scaffold per la densità del PCL.

L'analisi μ CT è stata eseguita solo per i campioni PCL-WP, PCL-AT₁, PCL-AT₂, PCL-AT₂-HA, PCL-AT₂-BP. Al fine di preservare la morfologia degli scaffold, tutti i campioni sono stati tagliati (altezza 1 cm, lunghezza 0.5 cm) con un bisturi in modo tale da avere una superficie regolare.

Il lato superiore di ogni campione è stato marcato in modo tale da mantenere lo stesso orientamento durante l'acquisizione μ CT e i test di compressione. I campioni sono stati scansionati seguendo la procedura di acquisizione standard per le macchine Skyscan 1172 HR μ CT (Skyscan, Aartselaar, Belgio). La macchina è stata settata utilizzando i seguenti parametri: tensione 57 KV; corrente 167 μ A; tempo di esposizione 242 ms; campo visivo (FOV) 1280 x 1024 pixel; dimensione del voxel isotropico 8 μ m.

Tutti i campioni analizzati sono stati sottoposti ad una rotazione di 360°, con uno step di rotazione di 0.4 gradi e con un frame medio pari a 1. I dati grezzi acquisiti, sono stati ricostruiti utilizzando N-Recon Software (Skyscan, Belgio): successive immagini assiali (salvate in formato bitmap) sono ricostruite utilizzando un algoritmo di proiezione. Le immagini in formato bitmap sono state

analizzate usando il μ CT-An Software: il volume di interesse (VOI) (3x1.59 mm) era localizzato al centro del campioni di PCL in modo tale da evitare artefatti dovuti al taglio durante la preparazione del campione. Tutti i campioni sono stati binarizzati usando gli stessi parametri descritti precedentemente.

La porosità e l'analisi quantitativa dei pori è stata effettuata sulla base degli indici strutturali misurati per i campioni di osso naturale come riportati dallo gruppo di studio di *Hildebrand*.

La porosità dei campioni era misurata basandoci sulla seguente equazione:

$$\Phi = 1 - BV/TV$$

Dove Φ è la porosità totale, BV è il volume dell'osso, TV il volume totale.

Lo spessore trascolare (Tb-Th) (pareti dei pori) e la separazione trascolare (Tb-Sp) (diametro dei pori), sono stati calcolati mediante misurazioni dirette. Le immagini 3D sono state ricostruite attraverso l'utilizzo di CT Vol Software (SkyScan, Belgio) e di Osirix (open-source software)

Gli scaffolds PCL-WP, PCL-AT₁, PCL-AT₂, PCL-AT₂-HA, PCL-AT₂-BP sono stati sottoposti a prove di compressione meccanica utilizzando il Material Testing stage (MTS, Skyscan, Artselaar Belgio), tutti i campioni sono stati compressi in modo continuo. Il carico massimo è stato di 22 Kg con visualizzazione in tempo reale della curva di spostamento.

6 Riproduzione di falange umana realizzata con policaprolattone

Per verificare che con il metodo dell'inversione di fase, da noi usato in questo lavoro, si possano realizzare strutture con forma e dimensione predeterminate, abbiamo prodotto una falange di una mano. La falange umana è stata donata dal laboratorio di Paleontologia dell'Università Ca'Foscari di Venezia. Successivamente a partire dall'osso naturale è stato realizzato uno stampo in silicone sul quale è stato poi colato il gel di PCL ottenuto con il procedimento descritto in precedenza. Lo stampo è stato posto a -30°C per 24 ore per la completa solidificazione. Il residuo di solvente è stato eliminato attraverso ripetuti lavaggi con etanolo a -30°C e acqua.

7 Colture cellulari: MC3T3-E1 e cellule staminali mesenchimali

7.1 MC3T3-E1

MC3T3-E1 sono preostoblasti di topo (*DMSZ Braunschweig, Germania*) sono state espanse in fiasche di coltura T75 (*BD Biosciences, San Jose, CA*) con α -modification Minimal Essential Medium (α -MEM) (*Invitrogen*) e 10% siero bovino fetale (FBS) (*Invitrogen*) senza antibiotico e incubate a 37°C, 5% CO₂. Il terreno di coltura è stata cambiato a giorni alterni. Le colture cellulari tra il passaggio 8 e il 12 sono state usate per gli esperimenti.

Le cellule MC3T3-E1 sono state utilizzate come controllo interno per i test di adesione, vitalità cellulare e di differenziamento osteogenico su sistemi di coltura su scaffold.

7.2 Cellule staminali mesenchimali (rMSC)

I femori e le tibie sono stati isolati da conigli in condizioni di sterilità. Le estremità di ciascun osso sono state rimosse e il midollo osseo è stato raccolto con l'inserimento di un ago da siringa (diametro 27 mm) in una delle estremità delle ossa. Il midollo osseo è stato lavato con Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (*Invitrogen*) arricchito con penicillina-streptomicina (APS) (*Sigma Aldrich*). Le cellule mononucleate (MNCs) sono state isolate mediante centrifugazione a gradiente di densità con Ficoll (*Invitrogen*). Le cellule sono state coltivate in α MEM contenente 15% di FBS, 2 mM Glutamax (*Invitrogen*) 1% APS in piastre da coltura (*BD Biosciences*) a 37°C, % CO₂. Il terreno di coltura è stato cambiato dopo 48 ore dalla semina per rimuovere le cellule non aderenti e ogni 3 giorni successivi. Ogni coltura primaria è stata nuovamente piastrata in due nuove piastre quando le cellule staminali mesenchimali (rMSC) avevano raggiunto il 70%-80% di confluenza. Per gli esperimenti sono state utilizzate subculture fino alla V generazione.

Il fenotipo delle cellule rMSC è stato analizzato mediante analisi citofluorimetrica, valutando specifici marker di staminalità, inoltre è stata eseguita una valutazione del potenziale osteogenico attraverso immunisto chimica (*Dati non riportati*).

8 Semina di cellule MC3T3-E1 e rMSC su scaffolds di PCL

Per gli studi biologici sono stati utilizzati i seguenti scaffolds:

- PCL-WP
- PCL-AT₂
- PCL-AT₂-HA e PCL-AT₂-BP

Gli scaffolds sono stati sterilizzati con etanolo 95% per 2 ore. Successivamente sono stati incubati con una soluzione di PBS (Phosphate Buffered Saline) (*Sigma Aldrich*) contenente il 2% di gentamicina/anfotericina (*Invitrogen*) per 2 ore. Infine le matrici polimeriche sono state lavate 3 volte con α -MEM 30 minuti ogni volta.

Le cellule MC3T3-E1 e le rMSC una volta raggiunta la confluenza del 80%-90% sono state staccate dalle piastre di coltura con una soluzione di tripsina 0.25% (*Sigma Aldrich*) ed EDTA 0.02% (*Sigma Aldrich*) in PBS per 2-3 minuti a 37°C e successivamente seminate sugli scaffolds (3×10^5 cells/cm²) e incubate a 37°C, 5% CO₂.

9 Valutazione dell'adesione, morfologia e crescita di popolazioni cellulari su PCL

9.1 Morfologia e adesione cellulare

La morfologia e l'adesione cellulare di popolazioni cellulari su scaffolds, è stata verificata attraverso l'uso della microscopia elettronica a scansione (SEM).

A differenti time points (24, 72 ore, 7 e 14 giorni), i campioni sono stati preparati per renderli adatti alla visione del microscopio, è stato rimosso il terreno di coltura, lavati con PBS 1X, e fissati in 3% glutaraldeide (*Sigma Aldrich*) in tampone cacodilato di sodio (0.1M pH 7.2) (*Sigma Aldrich*) per 24 ore a 4°C. In seguito gli scaffolds sono stati lavati con tampone cacodilato e disidratati con alcol etilico a concentrazione crescente (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%) e infine essiccati all'aria.

I campioni sono stati ricoperti con oro metallico e osservati al SEM.

9.2 Test di vitalità cellulare: MTS

La vitalità cellulare è stata determinata mediante il saggio colorimetrico CellTiter 96R AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega). Il reagente contiene un composto tetrazolico, (3-(4,5-dimetiltiazolo-2-il)-5-(3-carbossimetossifenil)-2-(4-solfofenil)-2H-tetrazolio) meglio noto come MTS e un reagente di accoppiamento elettronico, PES (fenazina etansolfato). MTS viene ridotto nelle cellule in un prodotto colorato, il formazano, solubile nei terreni di coltura. Questa conversione si accompagna alla produzione di NADPH o NADH da parte degli enzimi deidrogenasi mitocondriali in cellule metabolicamente attive.

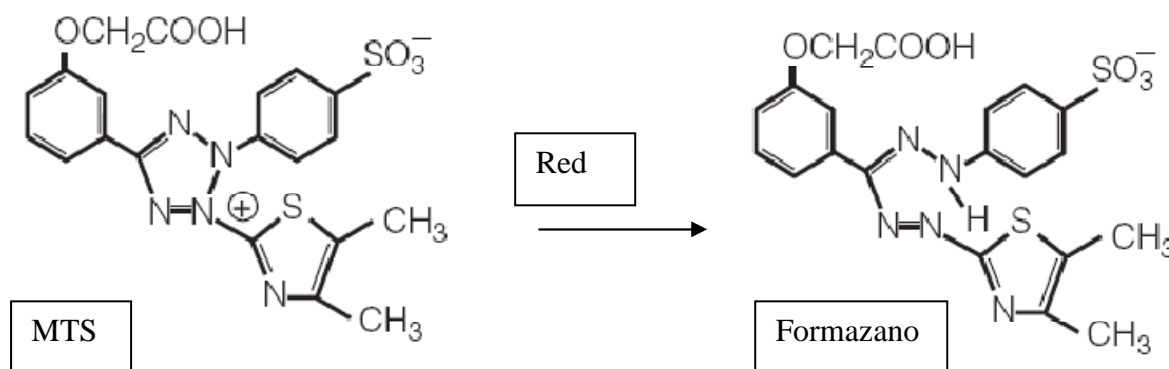


Figura 6: Reazione MTS

L'assorbanza del prodotto colorato viene misurata con lettore ELISA (*Ultra Microplate Reader Bio-Tek Instruments*) a 490 nm. La quantità di formazano prodotta è proporzionale alla quantità di cellule vive nel terreno di coltura.

Il saggio è stato eseguito in triplicato per quattro tempi diversi (24, 72 ore, e 7 14 giorni dopo la semina). Allo scadere dei tempi, precedentemente indicati, si è proceduto a togliere il terreno di coltura, eseguito un lavaggio con PBS 1X e si è aggiunta una soluzione di MTS al 20% in α MEM. I campioni sono stati incubati per 3 ore a 37°C in ambiente umidificato al 5% di CO₂. Al termine dell'incubazione un'aliquota di 100 μ l è stata prelevata, posta in una piastra da 96 pozzetti ed eseguita la lettura spettrofotometrica.

Sono state eseguite delle curve di taratura ($\text{cell number/cm}^2=2.5 \cdot 10^5 A^{490}-8.6 \cdot 10^4$, $R^2=0.99$) per le cellule MC3T3-E1, e ($\text{cell number/cm}^2=3.8 \cdot 10^5 A^{490}-1.1 \cdot 10^4$, $R^2=0.98$) per le cellule mesenchimali in modo tale da esprimere il dato di assorbenza in numero di cellule.

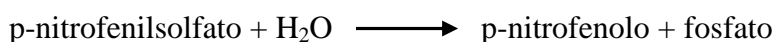
10 Valutazione del differenziamento osteogenico di popolazione cellulari su PCL

Tutte le popolazioni cellulari seminate su scaffolds, dopo 24 ore dalla semina sono state trattate con terreno osteogenico specifico. Il terreno utilizzato era composto da: α MEM, 10%FBS, 1% APS, 0.1 μ M desametasone, 10 nM (*Sigma Aldrich*) β -glicerofosfato e 0.05 mM (*Sigma Aldrich*) ac.ascorbico (*Sigma Aldrich*). In parallelo, sono stati realizzati dei campioni in cui le popolazioni cellulari erano mantenute in terreno di proliferazione ed utilizzate come controllo negativo. La valutazione del differenziamento osteogenico su MC3T3-E1 e su rMSC è stato verificato analizzando l'attività della fosfatasi alcalina ossea (bALP), e la deposizione di calcio sulla matrice extracellulare. Inoltre è stato eseguito uno studio di espressione di specifici marcatori osteogenici mediante la *Reazione di retro trascrizione e polimerizzazione a catena* (RT-PCR).

10.1 Attività della fosfatasi alcalina (bALP)

L'attività enzimatica della bALP è stata analizzata dopo 7-14-21 giorni di trattamento dei campioni con terreno differenziativo osteogenico. Le cellule su scaffolds sono state lisate con una soluzione di Triton 0.1% in Tris Buffer 10mM pH 7.5 (*Sigma Aldrich*), centrifugate e trattate con una soluzione di p-nitrofenilsolfato (p-NPP) (*Sigma Aldrich*) per 30 minuti a 37°C.

L'enzima bALP trasforma il substrato secondo la reazione:



inducendo il viraggio della soluzione ad un color giallo. La reazione veniva fatta terminare aggiungendo NaOH (*Sigma Aldrich*) 3 M e l'assorbanza è stata misurata con una lettura spettrofotometrica a 405 nm.

10.2 Saggio mineralizzazione in vitro

La mineralizzazione (depositi sali di calcio) della matrice extracellulare di popolazioni cellulari seminate su scaffolds di PCL è stata analizzata mediante Osteogenesis assay kit (*Millipore*).

I campioni sono stati fissati con una soluzione di formalina al 10% (*Sigma Aldrich*) per 15 minuti, poi sono stati lavati due volte con acqua distillata e incubati per 20 minuti a temperatura ambiente con Alizarin S. Al termine dell'incubazione i campioni sono stati lavati con acqua distillata e incubati con acido acetico 10% per 30 minuti sotto agitazione. Il monolayer cellulare ottenuto, è stato trasferito in un nuovo tubo e riscaldato a 85°C per 10 minuti, posto in ghiaccio per 5 minuti e centrifugato a 20000 rcf per 15 minuti. Al termine è stato aggiunto ammonio idrossido, poi le assorbanze delle soluzioni dei campioni differenziati e indifferenziati sono stati misurate per via spettrofotometrica a 405 nm.

10.3 Studio espressione marcatori osteogenici

Per verificare l'espressione di specifici marker del differenziamento osteogenico è stata eseguito uno studio di RT-PCR su cellule rMSC su supporto di PCL. Sono state le seguenti coppie di primer (*Invitrogen*):

Nome Primer	Sequenza 5'-3'
β -actina forward	AGATCTGGCACCACCTTCTACA
β -actina reverse	ACTCGTCATACTCCTGCTTGCTGA
Runx-2 forward	AGTTTGTTCTCTGACCGCCTCAGT
Runx-2 reverse	ATGGTCGCCAGACAGATTCATCCA
Osteopontina forward	CCGACCAAGGAACAAT
Osteopontina reverse	CTCTGAAGCACCAGGATA
Osteocalcina forward	CATGAGAGCCCTCACA
Osteocalcina reverse	AGAGCGACACCCTAGAC
Collagene I forward	GGCAAACATGGAAACCG
Collagene I reverse	TCAAGGAAGGGCAAACG

Tabella 3: Coppie di primer utilizzate per valutare l'espressione genica tramite RT-PCR

10.3.1 Estrazione mRNA

Le popolazioni cellulari su scaffold, sono state lavate con PBS 1X, trattate con 0.8 ml di Trizol (Invitrogen) per 5 minuti a temperatura ambiente. Si è proceduto con l'aggiunta di 0.160 ml di cloroformio (*Sigma Aldrich*), i campioni sono stati agitati vigorosamente per 15 secondi, lasciati incubare a temperatura ambiente per 10 minuti ed infine centrifugati a 12000 rcf per 15 minuti a 4°C. La fase acquosa è stata prelevata, trasferita in un nuovo tubo RNase free (*Sarstedt*) e trattata con 0.8 ml di isopropanolo (*Sigma Aldrich*) per 10 minuti a temperatura ambiente. Dopo una centrifugazione a 12000 rcf per 10 minuti a 4°C, il pellet è stato lavato con etanolo 75%, il tutto centrifugato a 7500 rcf per 5 minuti a 4°C. Al termine il pellet è stato risospeso in 10 µl di acqua RNase free (*Invitrogen*).

La quantificazione dell'mRNA è stata eseguita mediante NanoDrop 2000 (*Thermo Scientific*), ogni misurazione a 260 nm è stata effettuata con 1 µl di campione. Inoltre è stato verificato l'assorbimento a 280 nm per determinare il rapporto 260/280 che compreso tra 1.8 e 2.0 indica la purezza dell'RNA estratto.

10.3.2 Reazione di RT-PCR

La miscela di reazione per la retrotrascrizione da RNA a cDNA è stata eseguita nel seguente modo: in un tubo RNase free sono stati aggiunti i reagenti: dNTP mix, oligo dT (*Sigma Aldrich*), template RNA estratto, acqua RNase free. La miscela è stata incubata a 70°C per 10 minuti, poi tubi sono stati posti in ghiaccio, ed è stato aggiunto: M-MLV Reverse Transcriptase, M-MLV Reverse Transcriptase Buffer 10X, inibitore RNase, acqua ottenendo un volume finale di 20 µl. Il tutto è stato incubato per 10 minuti a temperatura ambiente, poi a 37°C per 50 minuti e infine 10 minuti a 94°C.

Dopo aver ottenuto il cDNA si è passato alla sua amplificazione utilizzando la Ready Mix Taq PCR Reaction Mix (*Sigma Aldrich*). Al cDNA ottenuto è stato aggiunto la Ready Mix Taq PCR, i primer e acqua per un volume finale di reazione pari a 50 µl. La reazione è stata eseguita utilizzando un termociclatore T Gradient (Biometra) con il programma che ha previsto: 5 minuti a 94°C, e poi 35 cicli composti da: denaturazione a 94°C per 1 minuto, annealing per 1 minuto a temperature diverse in base ai diversi primer (vedi tabella 4), estensione a 72°C per 1 minuto e 30 secondi. Alla fine dei 35 cicli la miscela di reazione è stata portata a 72°C per 10 minuti per l'estensione finale.

Nome primer	Temperatura di Annealing	Peso molecolare amplificati (bp)
β -actina	59°C	843
Runx-2	59°C	778
Osteocalcina	59°C	310
Osteopontina	52°C	581
Collagene I	56°C	1112

Tabella 4: Temperature di Annealing e peso molecolare dei prodotti amplificazione

10.3.3 Elettroforesi su gel di Agarosio

Gli amplificati ottenuti tramite RT-PCR sono stati analizzati per mezzo di un'analisi elettroforetica su gel di agarosio (*Invitrogen*) al 2% in TBE (TrisBorato-EDTA) (*Invitrogen*) al 1% contenente gel red (1:10000) (*Biotium*).

Il gel di agarosio è stato lasciato solidificare per circa 1 ora. Ogni campione è stato caricato con 2 μ l di soluzione colorante Blue Juice (*Invitrogen*). Come riferimento di pesi molecolari (50 e 2000 bp) è stato utilizzato PCR-marker(*Sigma Aldrich*).

I campioni amplificati sono stati visualizzati esponendoli ai raggi UV con lo strumento GelDoc (*BioRad*).

11 Analisi dei dati

Tutti i risultati sono stati espressi come valori medi \pm SD di tre esperimenti separati. Le differenze significative sono state valutate con l'analisi della varianza (ANOVA), seguita dal t-test di Student-Newman-Keuls come test post hoc. Valori di *p* inferiore a 0.05 sono stati considerati significativi

RISULTATI

1. Caratterizzazione scaffolds

La valutazione della morfologia superficiale degli scaffolds di PCL e la dimensione dei pori è stata valutata attraverso l'osservazione al SEM. Mentre la valutazione complessiva della porosità è stata ottenuta applicando alle matrici il metodo della densità o attraverso l'utilizzo di μ CT.

1.1 Analisi SEM e EDX

Lo scaffold PCL-WP presenta una superficie esterna liscia, mentre la struttura interna mostra formazioni globulari con un diametro compreso tra 20-30 μ m. Queste strutture globulari mostravano dei macropori di circa 10 μ m. (Fig. 7). La porosità totale era del 70%, calcolata tramite il metodo della densità, però con poca interconnessione tra i vari pori.

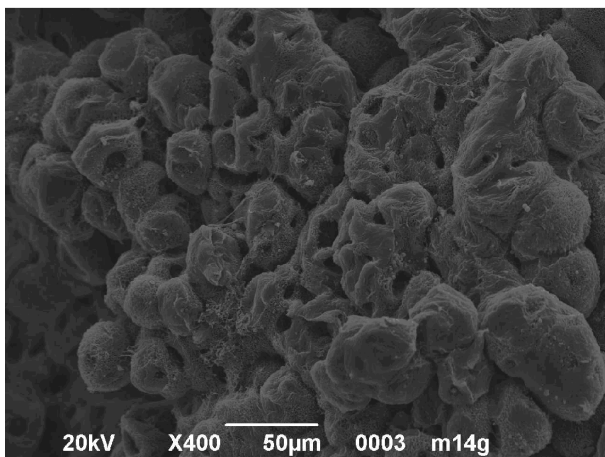


Figura 7: Analisi SEM: PCL senza utilizzo di porogeno. Ingrandimento 400X

L'analisi SEM per gli scaffolds PCL-P ha mostrato che utilizzando PEG/PCL nel rapporto 15/100 si sono ottenute matrici con pori con diametro compreso tra 10 e 50 μ m (Fig. 8A), mentre PEG/PCL

con rapporto 30/100 ha mostrato una struttura interna altamente microporosa (Fig. 8B). Si è osservato invece una forma molto compatta per PEG/PCL con rapporto 100/100 (Fig. 8C).

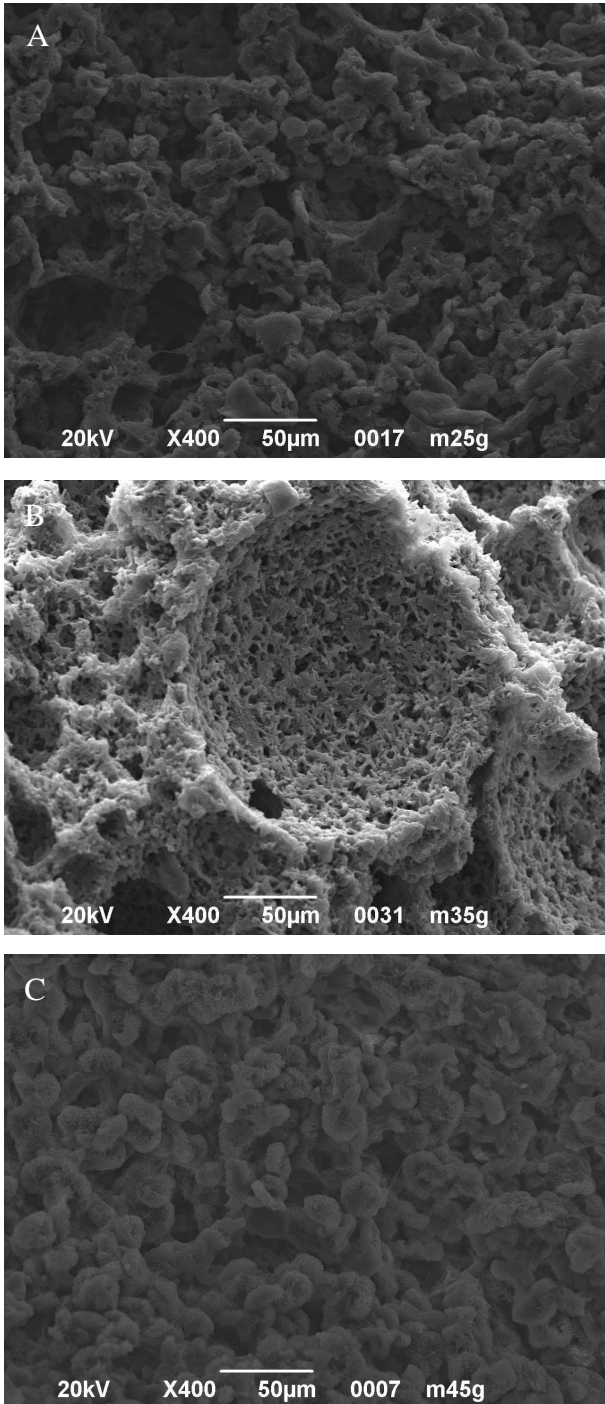


Figura 8: Immagine SEM di PCL ottenuto con PEG come agente porogeno. A) PCL, 15% PEG1000, B) PCL, 30% PEG 1000, C) PCL, 100%PEG. Ingrandimento 400X.

PCL-PEG 15% ha mostrato una porosità totale del 65%, mentre PCL-PEG 30% presentava un valore di porosità del 72%, infine PCL-PEG 100% aveva un valore di 58%.

Quando è stato usato il saccarosio non micronizzato in mulino come agente porogeno, i macropori evidenziati con SEM presentavano un diametro medio vicino alla grandezza delle particelle di saccarosio di partenza. Inoltre i pori appaiono regolarmente distribuiti sull'intera superficie (Fig. 9A,B,C). La porosità calcolata era la seguente: PCL-15% saccarosio 78%, PCL-30% saccarosio 75%, PCL-100% saccarosio 68.3%.

Nelle matrici PCL-S₁ si osservano micropori interconnessi tra di loro con diametro < 5 µm, mentre la presenza di macropori 50 µm era molto limitata, con scarsa interconnessione. La porosità totale era compresa tra 75-80%, dove si è osservato un aumento proporzionale alla quantità di porogeno presente (Fig. 9D,E,F).

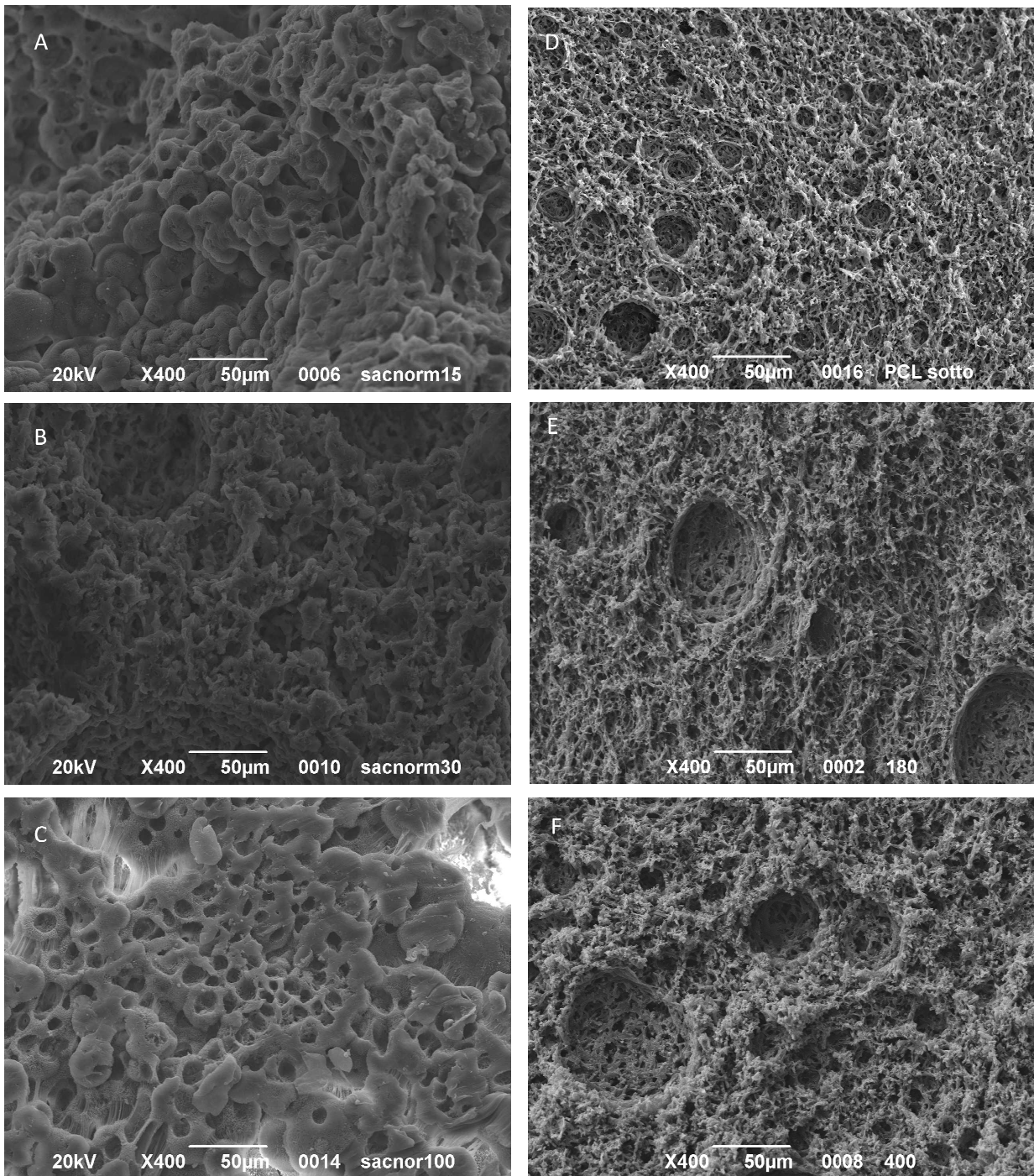


Figura 9: Immagine SEM di PCL ottenuto con saccarosio non micronizzato (A-C), micronizzato (D-F) come agente porogeno. A) PCL-15% saccarosio, B) PCL-30% saccarosio, C) PCL-100% saccarosio, D) PCL-15% saccarosio (50-140µm), E) PCL-15% saccarosio (140-180µm), F) PCL-15% saccarosio (180-400 µm). Ingrandimento 400X.

Gli scaffolds PCL-F sono stati realizzati con l'aggiunta di sfere di fruttosio (150-400 µm) come porogeno . PCL-F con rapporto tra fruttosio/polimero 25/100 (Fig. 10A), 50/100 (Fig. 10B) e

100/100 (Fig. 10C) erano caratterizzati dalla presenza di cavità sferiche omogeneamente distribuite sull'intera superficie delle matrici. La grandezza di queste sfere era compresa tra 50e 200 μm , ed erano localizzate all'interno di una matrice continua microporosa di PCL. La porosità globale è risultata essere dipendente dalla quantità di fruttosio aggiunta, comunque inferiore dell'80% in tutti i campioni.

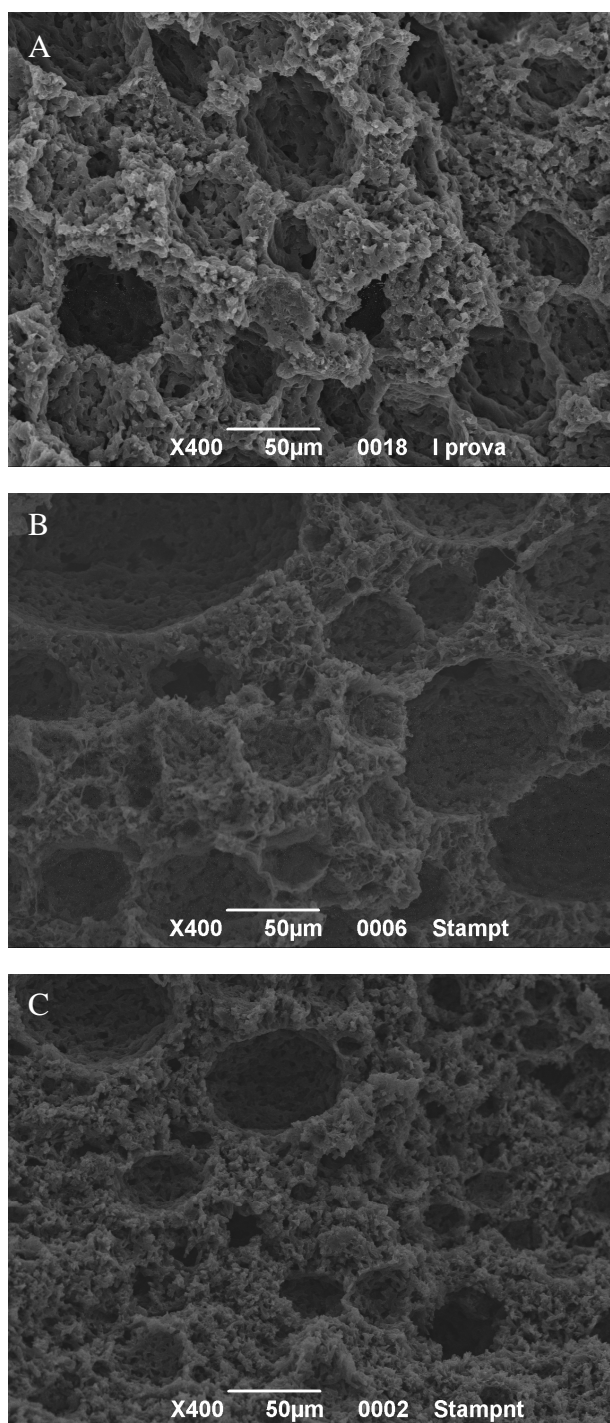


Figura 10: Immagine SEM di PCL ottenuto con sfere di fruttosio come porogeno (diametro 150-400 μm). A) PCL-25% sfere di fruttosio, B) PCL-50% sfere di fruttosio, C) PCL-100% sfere di fruttosio. Ingrandimento 400X.

Gli scaffolds realizzati con sfere o fili di alginato di calcio, come porogeno, all'analisi al SEM presentavano una struttura interna e una morfologia del tutto simili. (Fig. 11). Entrambi gli scaffold presentavano una distribuzione bimodale della porosità, con pori grandi (50-250 μm) e piccoli (5-10 μm), e una porosità totale compresa tra 72% e 79%.

Usando alginato di calcio, in forma sferica o di fili, noi abbiamo ottenuto degli scaffolds con buona porosità e con ampia distribuzione della grandezza dei pori, due proprietà richieste per un sostituto osseo.

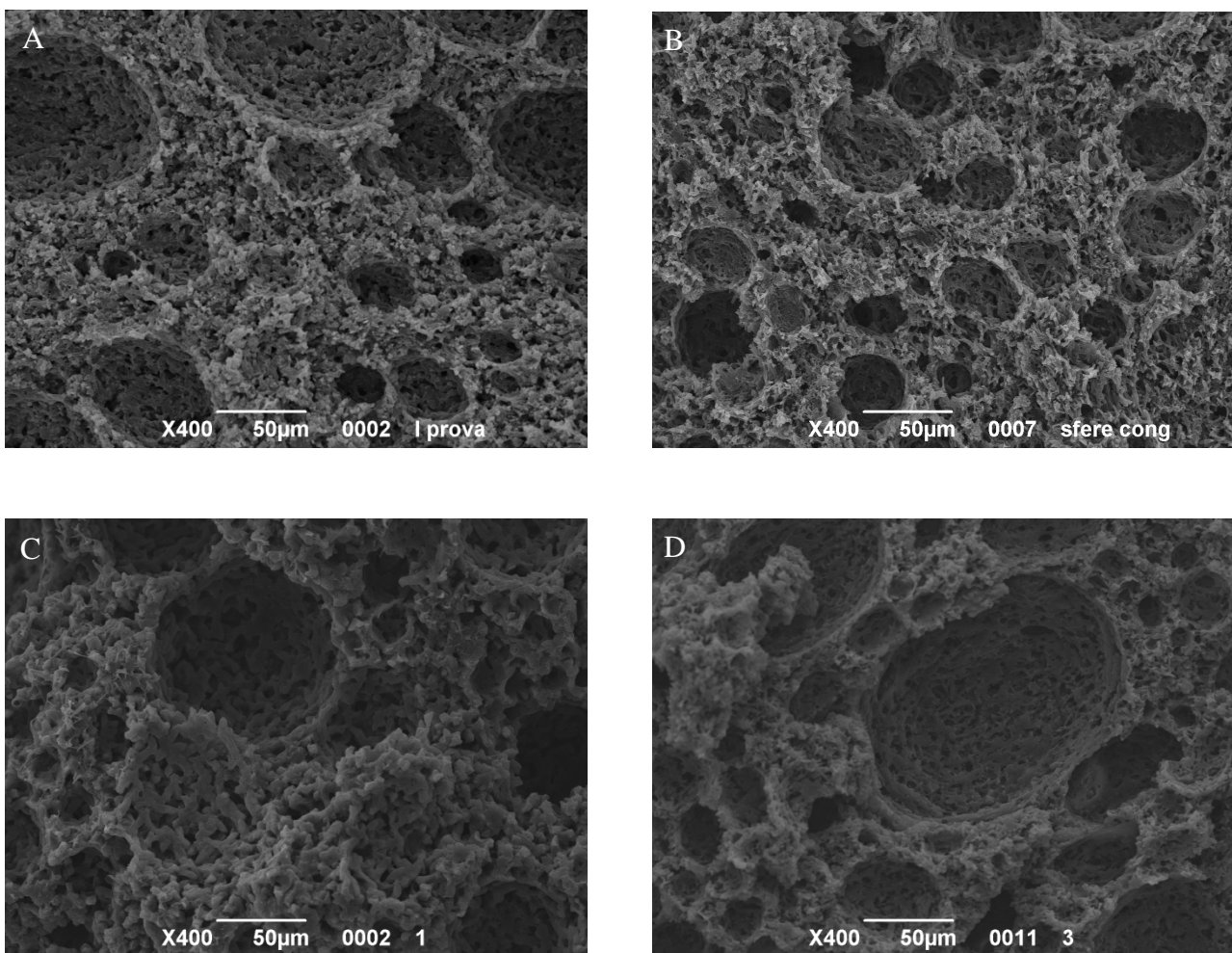


Figura 11: Immagine SEM di scaffolds di PCL usando sfere di alginato di calcio (800 μm diametro) (A, B) e fili di alginato di calcio (C,D) come agente porogeno. A) PCL-sfere di Ca^{2+} alginato (100/100), B) PCL-sfere di Ca^{2+} alginato (200/100), C) PCL-fili di Ca^{2+} alginato (100/100), D) PCL-fili di Ca^{2+} alginato (200/100). Ingrandimento 400X.

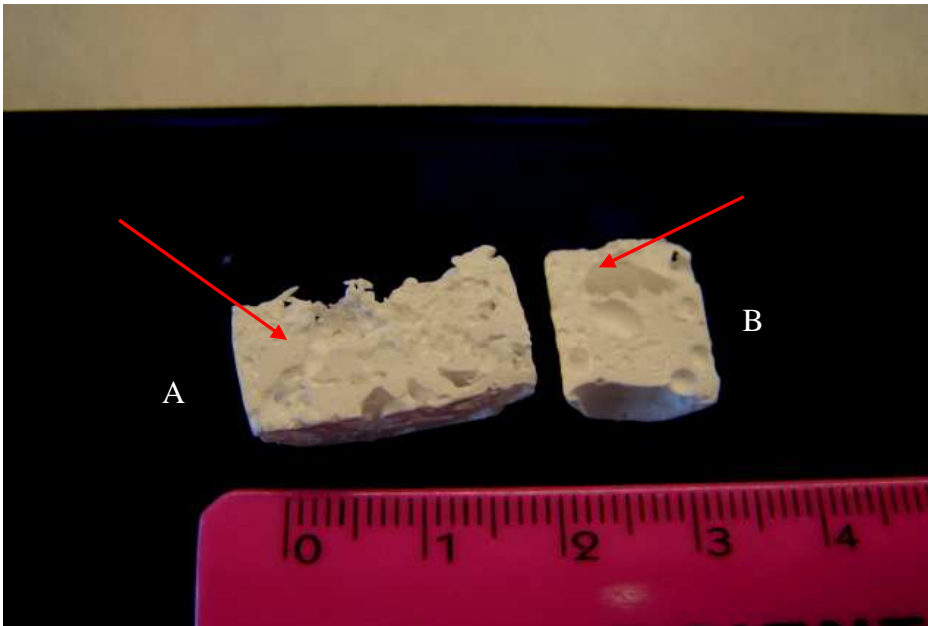


Figura 12: Sezione trasversale degli scaffolds PCL con fili di Ca^{2+} alginato (A) e con sfere di Ca^{2+} alginato (B).

Gli scaffolds ottenuti con i fili di alginato di calcio, mostrano una appropriata interconnettività (Fig. 12A), rispetto a PCL-AS (Fig. 12B), e sulla base di queste evidenze le successive caratterizzazioni attraverso μCT , vitalità cellulare, e studi di differenziamento osteogenico sono stati effettuati solo su PCL-WP, PCL-AT₁ e PCL-AT₂.

Le matrici PCL-AT₂-HA e PCL-AT₂-BP, al microscopio elettronico presentano una morfologia simile agli scaffolds PCL-AT, cioè con una distribuzione bimodale dei pori (Fig. 13). La porosità totale calcolata per PCL-AT₂-HA è stata di 82.5%, mentre per PCL-AT₂-BP di 84%.

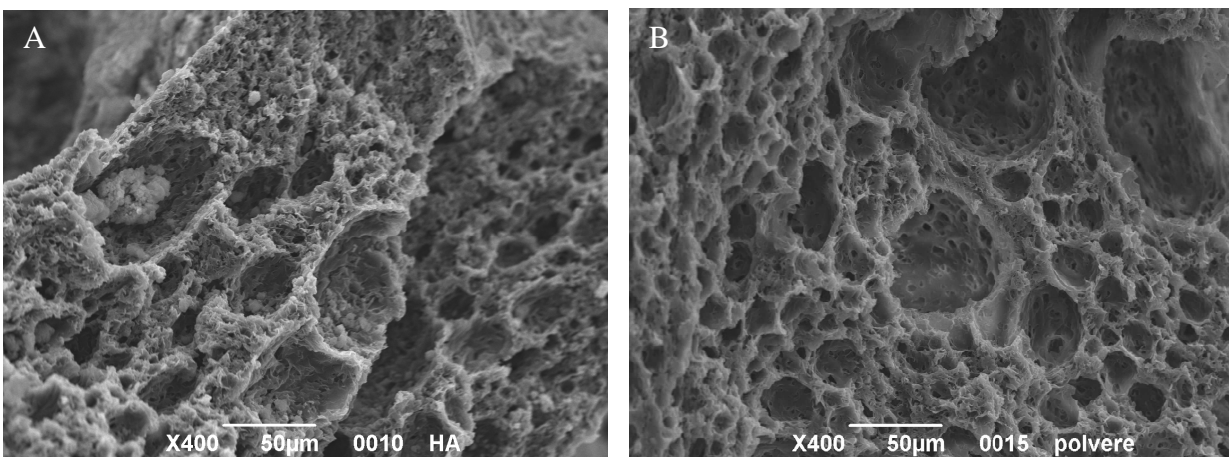


Figura 13: Immagine SEM di scaffolds PCL con fili di alginato di calcio come porogeno, addizionati di idrossiapatite HA (A) e con polvere d'osso (B). Ingrandimento 400X.

Le immagini SEM inoltre hanno rilevato la presenza dei cristalli di idrossiapatite, nei due scaffolds sopracitati, inoltre per avere la conferma analitica che i cristalli osservati fossero effettivamente di HA, è stata eseguita l'analisi EDX la quale ha messo in evidenza i picchi caratteristici di calcio e fosforo. (Fig. 14).

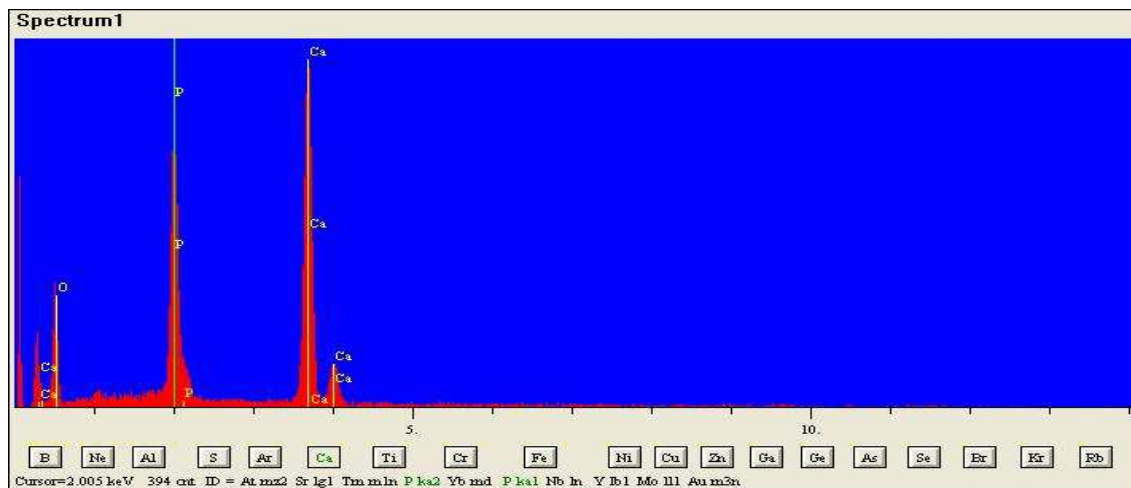


Figura 14: Analisi EDX dello spettro.

Dato che la citotossicità di THF è molto elevata, i residui di solvente sono stati completamente rimossi dalla matrice prima della semina di popolazioni cellulari, come dimostrato dal profilo della soluzione di alcool etilico dopo il terzo lavaggio, attraverso l'analisi gas cromatografia-spettroscopia di massa (Fig. 15).

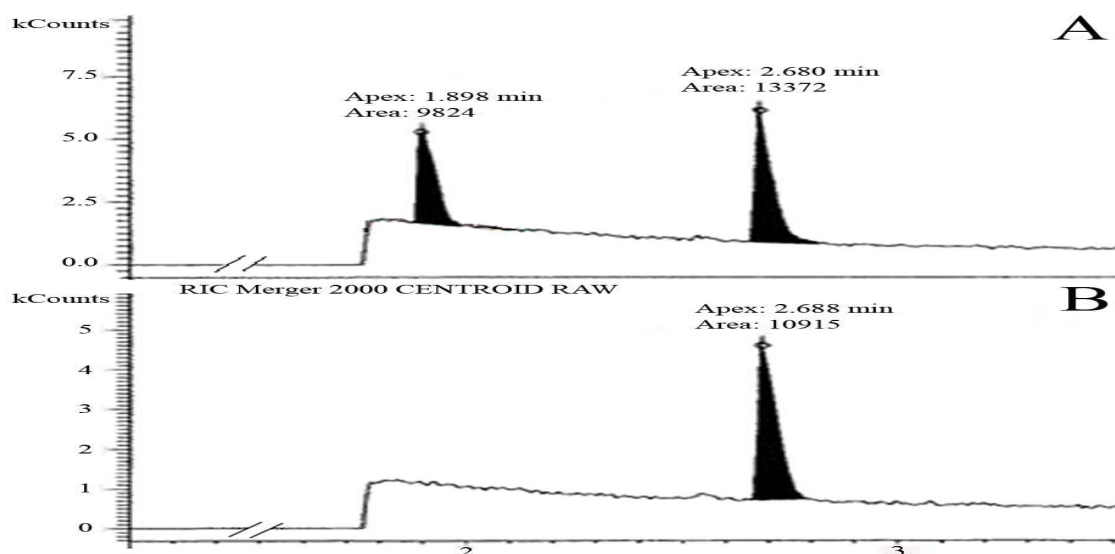


Figura 15: Valutazione dei residui del solvente THF all'interno degli scaffolds PCL attraverso gas cromatografia – spettroscopia di massa: (A): gas cromatogramma della soluzione di THF (0.01M) usata come riferimento, (B): gas cromatogramma del terzo lavaggio della soluzione di etanolo usato per l'estrazione del solvente.

1.2 Analisi MicroCT

L'analisi MicroCT è stata effettuata solo per i campioni: PCL-WP, PCL-AT₁, PCL-AT₂, PCL-AT₂-HA e PCL-AT₂-BP. Nei grafici sotto riportati (Fig.16) si evidenzia come PCL-WP presenti la maggior parte dei pori con un diametro compreso tra 30 e 100 μm . PCL-AT₁ possiede pori più grandi rispetto a PCL-WP con un presenza più rilevante di pori tra 110 e 270 μm .

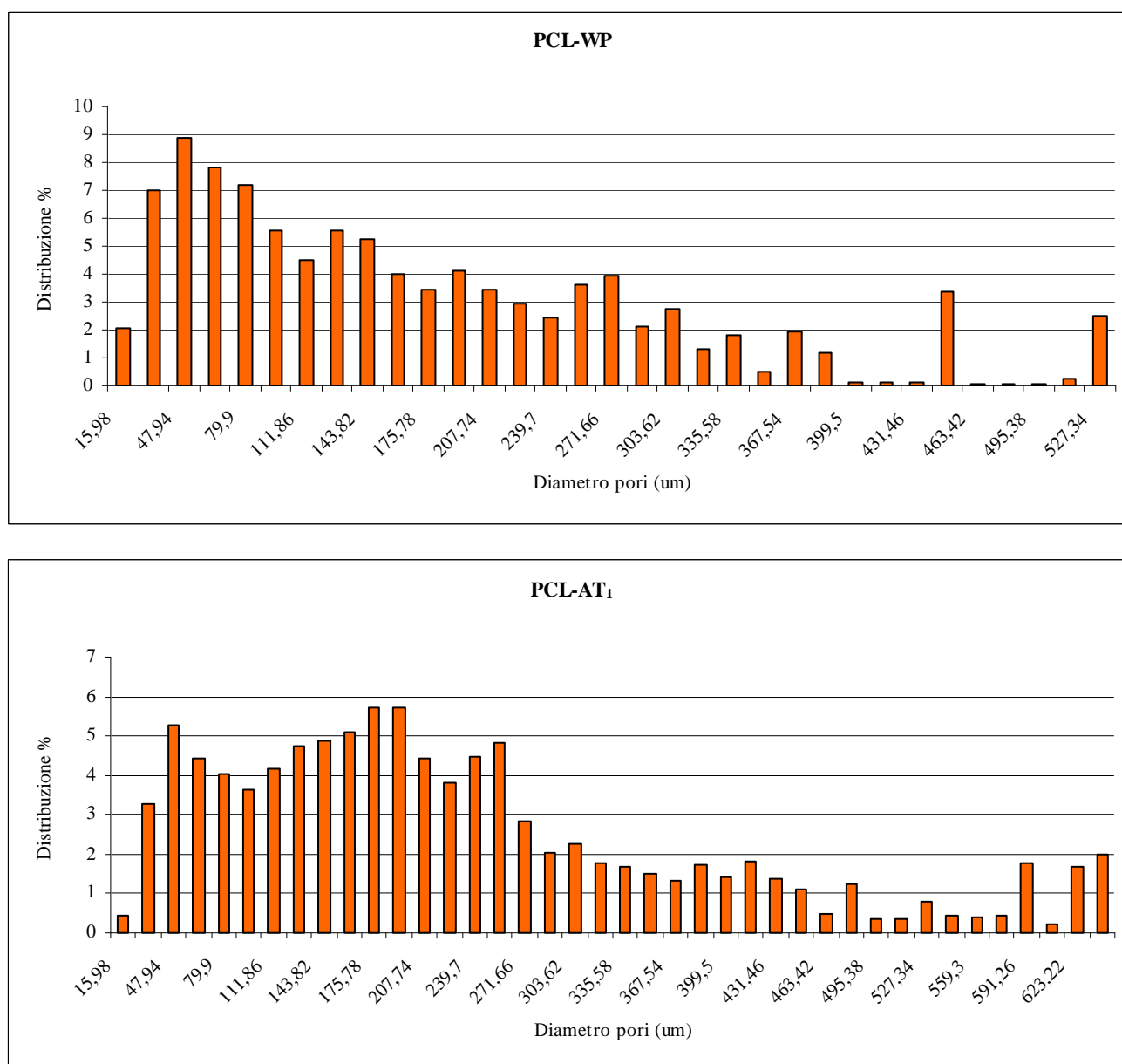


Figura 16: Valori di TbSp (separazione trabecolare o diametro dei pori) misurati tramite MicriCT di scaffolds PCL-WP, PCL-AT₁.

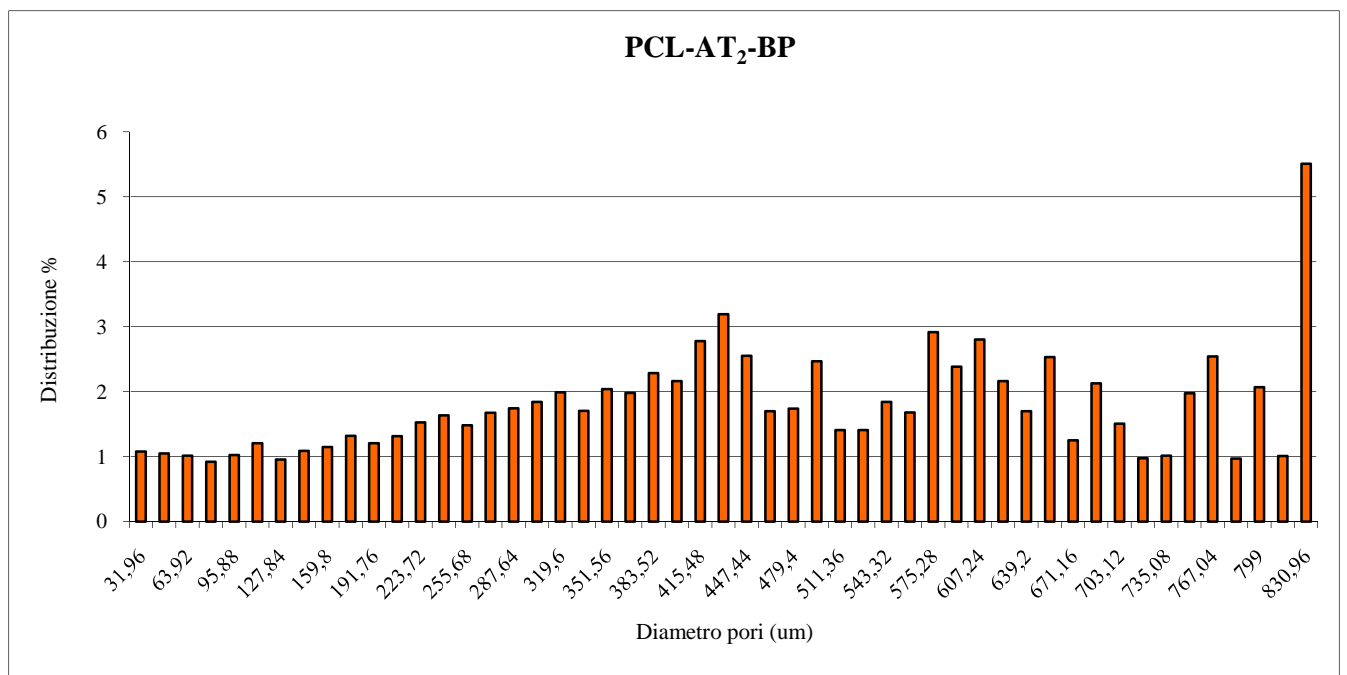
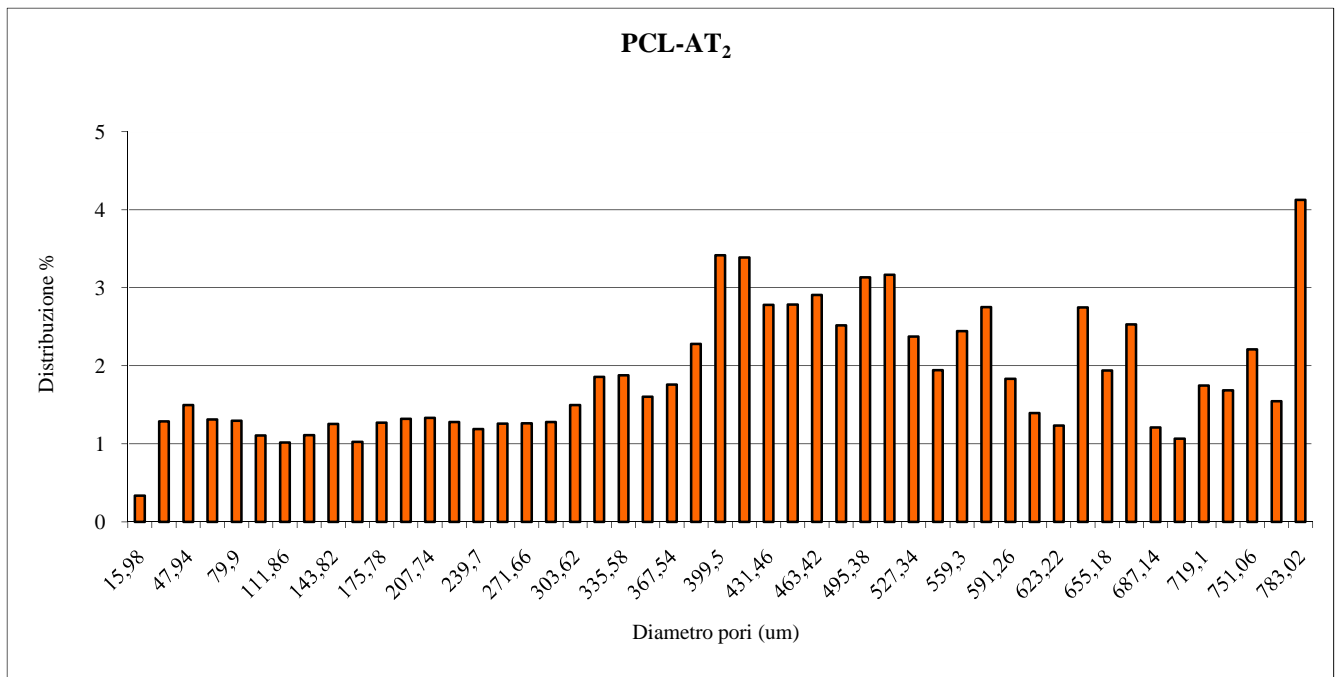


Figura 17: Valori di TbSp (separazione trabecolare o diametro dei pori) misurati tramite MicriCT di scaffolds PCL-AT₂, .PCL-AT₂-BP.

PCL-AT₂ e PCL-BP hanno un profilo di Tb Sp (Fig 17) molto simile, dove presentano un'alta concentrazione di pori con un diametro di circa 450 μm , mentre sono presenti pochi pori con diametro inferiore a 100 μm .

Lo scaffold PCL-HA (Fig. 18) possiede una distribuzione più omogenea dei pori rispetto agli altri scaffolds, infatti sono presenti sia pori piccoli ($\sim 50 \mu\text{m}$) sia pori grandi ($\sim 450 \mu\text{m}$)

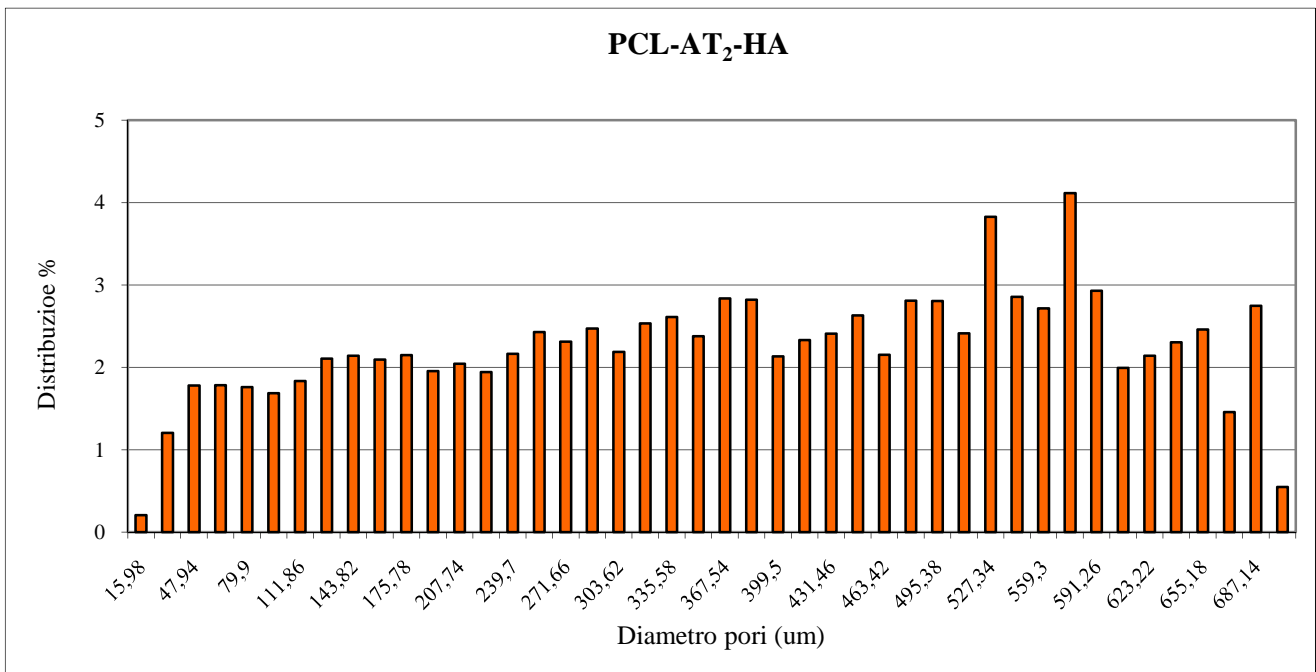
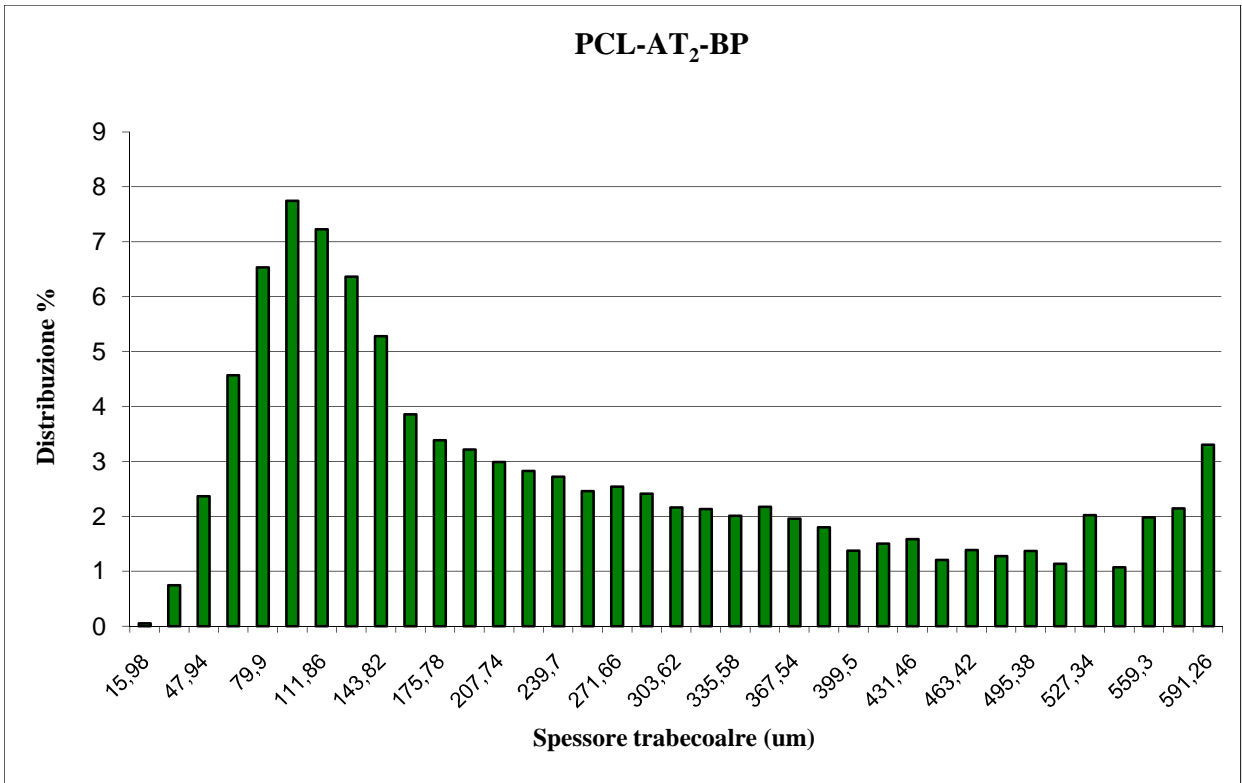
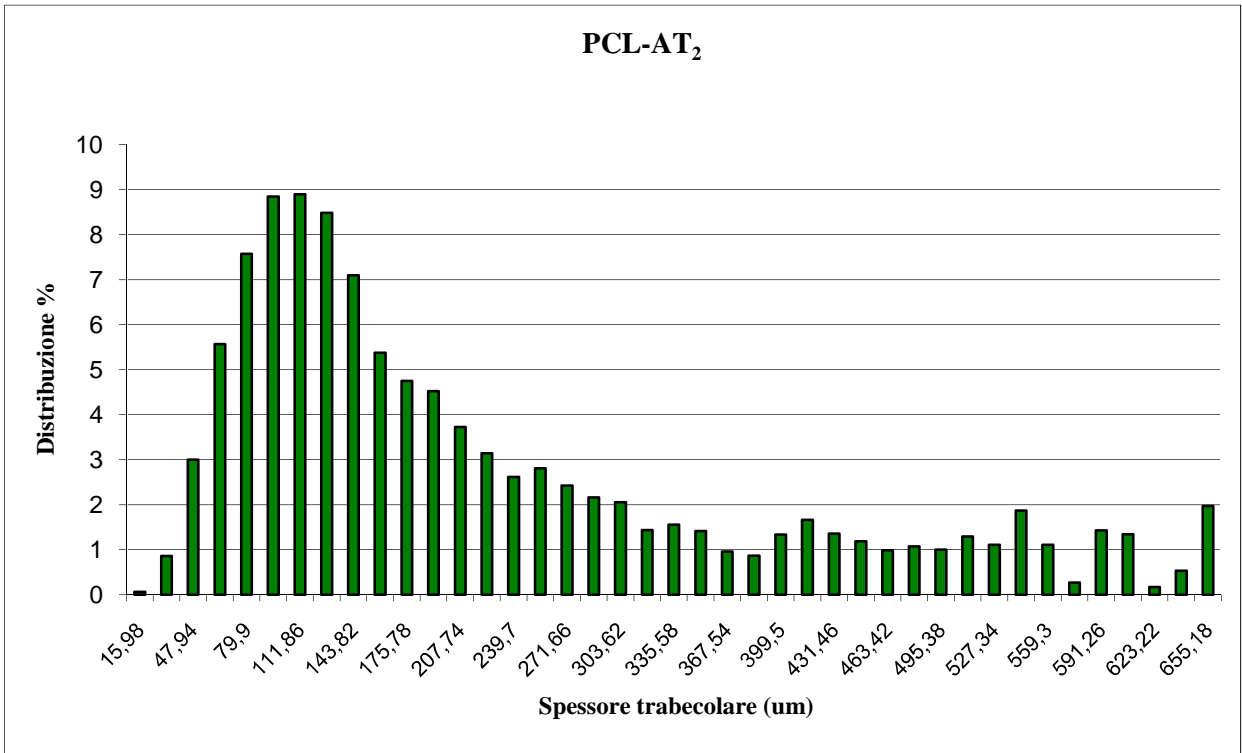


Figura 18: Valori di TbSp (separazione trabecolare o diametro dei pori) misurati tramite MicroCT di scaffolds PCL-AT₂-HA.

PCL-WP e PCL-AT₁ possiedono trabecole con uno spessore piccolo ($\sim 115 \mu\text{m}$) questo perché gli scaffolds hanno una distribuzione molto fitta di pori piccoli. PCL-AT₂ e PCL-AT₂-BP presentano un profilo simile di Tb Th, dove si può osservare una distribuzione omogenea dello spessore trabecolare con un picco vicino ai 150 μm . Lo scaffold PCL-AT₂-HA ha mostrato un profilo dove sono ugualmente distribuite trabecole piccole ($\sim 100 \mu\text{m}$) e grandi ($\sim 350 \mu\text{m}$).



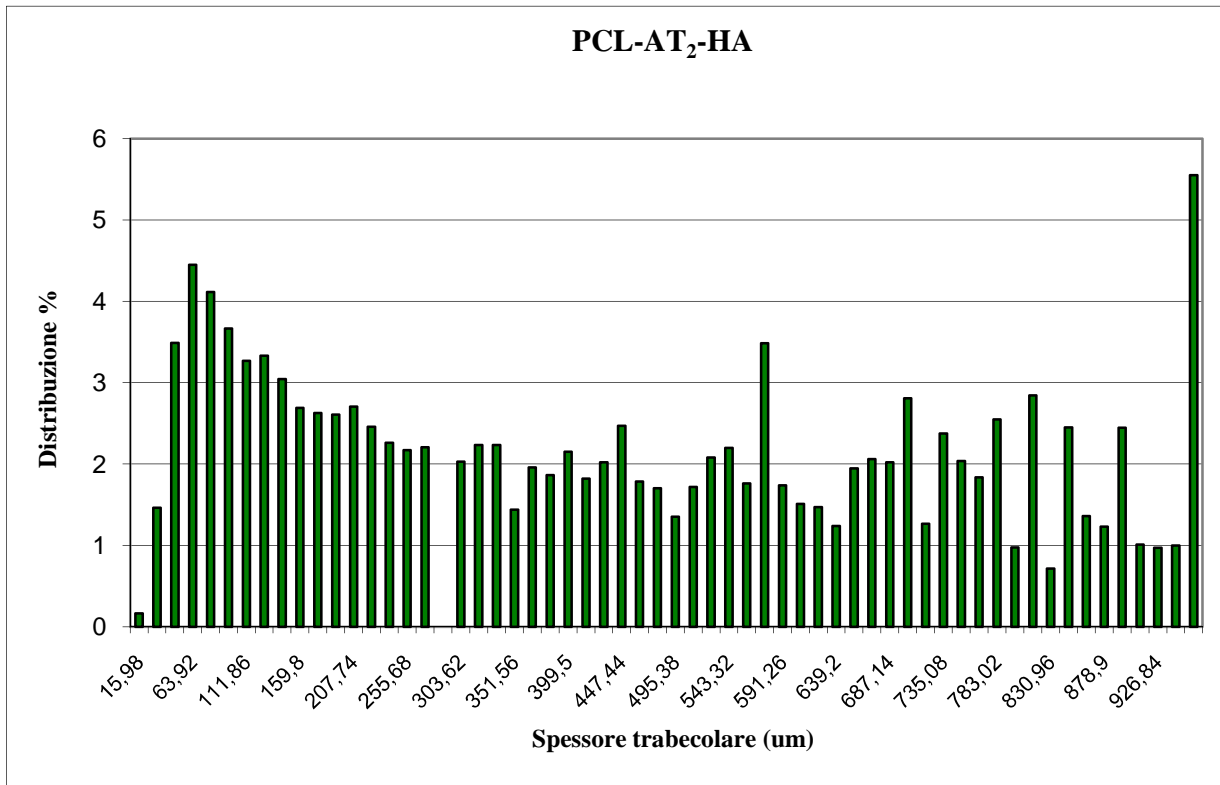


Figura 19: Valori di TbTh (spessore trabecole) misurati tramite MicroCT di scaffolds: PCL-WP, PCL-AT₁, PCL-AT₂, PCL-AT₂-HA e PCL-AT₂-BP

Il polimero PCL-WP ha resistito ad una carico massimo di 3200 g senza subire deformazione, per gli altri polimeri sono stati registrati i seguenti valori: PCL-AT₁ 3447 g, PCL-AT₂ 1749 g, PCL-AT₂-HA 3867 g, PCL-AT₂-BP 2333 g (Fig 20). Tutte le matrici hanno evidenziato una scarsa resistenza al carico rispetto all'osso naturale, riconducibile alla insufficiente presenza della componente minerale (idrossiapatite) la quale permette di avere un materiale più resistente. Le matrici PCL-WP, PCL-AT₂, PCL-AT₁ presentano un ricovero elastico abbastanza elevato, mentre si è riscontrato un valore basso per PCL-AT₂-HA, PCL-AT₂-BP, questo perchè HA e BP rendono il polimero più rigido e meno elastico, cioè più simile all'osso naturale.

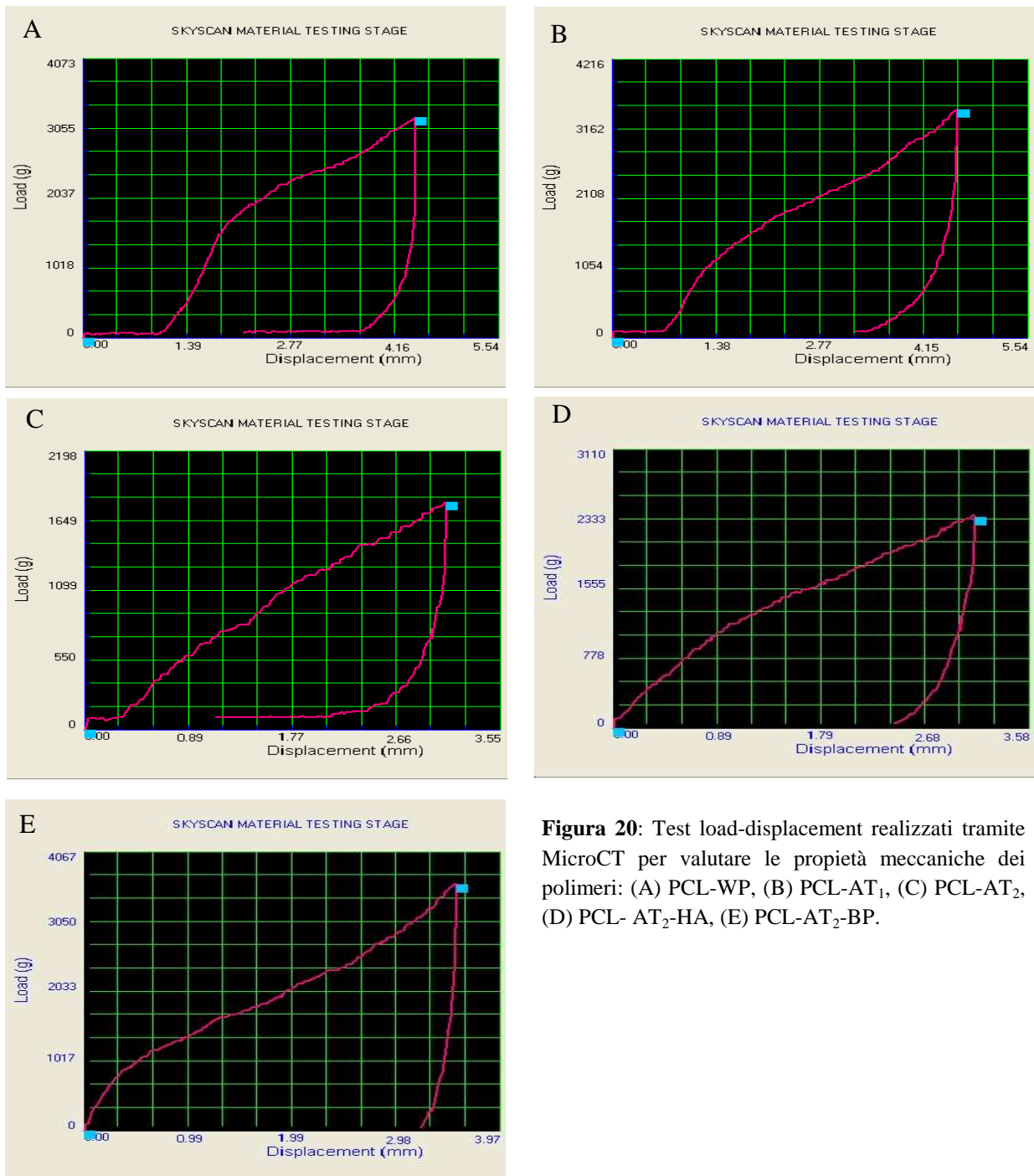


Figura 20: Test load-displacement realizzati tramite MicroCT per valutare le proprietà meccaniche dei polimeri: (A) PCL-WP, (B) PCL-AT₁, (C) PCL-AT₂, (D) PCL-AT₂-HA, (E) PCL-AT₂-BP.

La ricostruzione tridimensionale evidenzia una maggiore porosità e la presenza di numerosi interconnessioni nei polimeri PCL-AT₂, PCL-HA, PCL-BP rispetto a PCL-WP che presenta una struttura compatta come riportato in Fig 21.

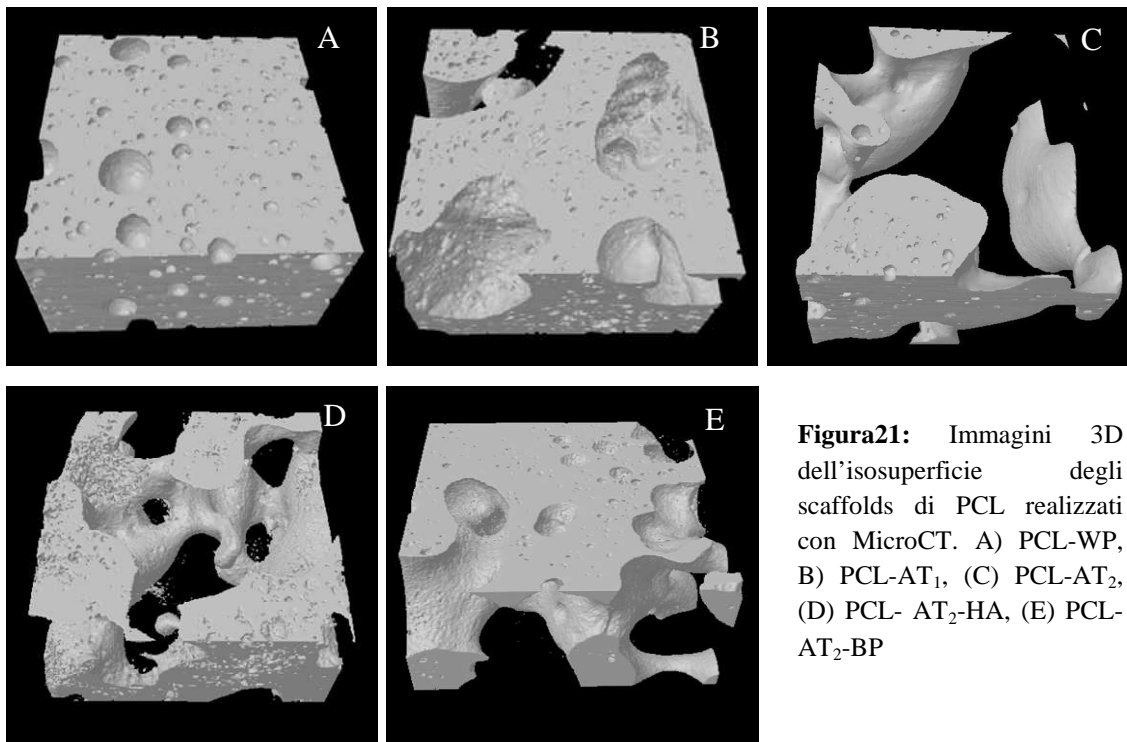


Figura21: Immagini 3D dell'isosuperficie degli scaffolds di PCL realizzati con MicroCT. A) PCL-WP, B) PCL-AT₁, (C) PCL-AT₂, (D) PCL- AT₂-HA, (E) PCL-AT₂-BP

Campione	$\Phi(\%)$ MicroCT	$\Phi(\%)$ metodo densità
PCL-WP	21,59±7,06	70±3,75
PCL-AT ₁	47,71±4,02	75,8±3,35
PCL-AT ₂	51,83±5,30	79,6±1,17
PCL- AT ₂ -HA	55,92±5,31	82,5±0,46
PCL- AT ₂ -BP	52,53±3,15	84±0,43
Osso trabecolare	52-96	Dati non disponibili in letteratura

Tabella 5: Confronto tra le porosità totali calcolate attraverso MicroCT e metodo della densità, degli scaffolds di PCL, con la porosità dell'osso trabecolare naturale.

2. Riproduzione di falange umana realizzata con policaprolattone

Usando uno stampo di silicone (Fig 22A), ottenuto partendo da un modello di osso di falange umana, abbiamo realizzato uno scaffold di PCL con una forma predeterminata. Lo scaffold di policaprolattone ottenuto usando latecnica dell'inversione di fase e lo stampo di silicone, presentava una contrazione dell'8% rispetto alle dimensioni reali dell'osso di partenza (Fig 22B). Tale effetto può essere superato con uno stampo di dimensioni leggermente superiori, dell'osso originale come si vede nella (Fig 22C) in cui la protesi ha le dimensioni richieste. Lo stampo è stato ottenuto mediante l'uso di modelli 3D computerizzati e stampanti stereolitografiche. La riproduzione di PCL da noi realizzata presenta tutte le caratteristiche esterne tipiche di una falange ossea umana



Figura 22: Stampo di silicone (A), utilizzato per realizzare uno scaffold di PCL con forma predeterminata. Confronto tra falange d'osso umano (centro) la riproduzione polimerica (sx) e la riproduzione in resina (dx) (B). Usando uno stampo con dimensioni maggiorate dell'8% rispetto all'osso originale, si ottiene una matrice comparabile con la falange di partenza (C).

3. Colture cellulari

La tecnica di estrazione da noi utilizzata per ottenere cellule MSC ha consentito di ottenere colture cellulari con minime o nulle contaminazioni di altri tipi cellulari. Dopo 24 ore dalla semina le cellule apparivano adese alla fiasca di coltura e con una morfologia di tipo fibroblastoide, inoltre erano presenti numerosi granulazioni a livello perinucleare (Fig 23A). Le popolazioni cellulari di MSC raggiungevano la confluenza del 90% dopo 2 giorni di coltura.

Le cellule di linea MC3T3-E1 dopo la semina presentavano anch'esse una forma fibroblastoide dopo 24 ore dalla semina. Diversamente dalle cellule staminali mesenchimali le popolazioni MC3T3-E1 raggiungevano la confluenza massima dopo 4 giorni di coltura (Fig 23B).

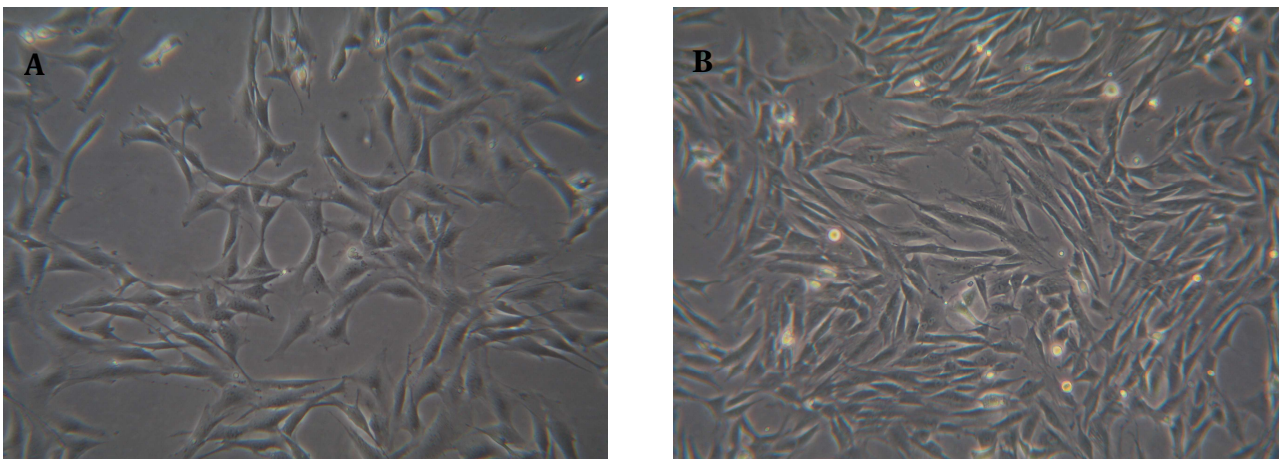


Figura 23: Microscopia ottica a contrasto di fase di MSC di coniglio estratte da midollo osseo (A) e MC3T3-E1 preosteoblasti di topo (B). Ingrandimento 200X.

4. Biocompatibilità degli scaffolds di policaprolattone

4.1 Vitalità cellulare

La vitalità cellulare delle popolazioni cellulari di MSC e MC3T3-E1 seminate sugli scaffolds PCL-WP, PCL, PCL-AT₂, PCL-AT₂-HA, PCL-AT₂-BP è stata valutata attraverso il saggio dell'MTS (Fig 24A,B).

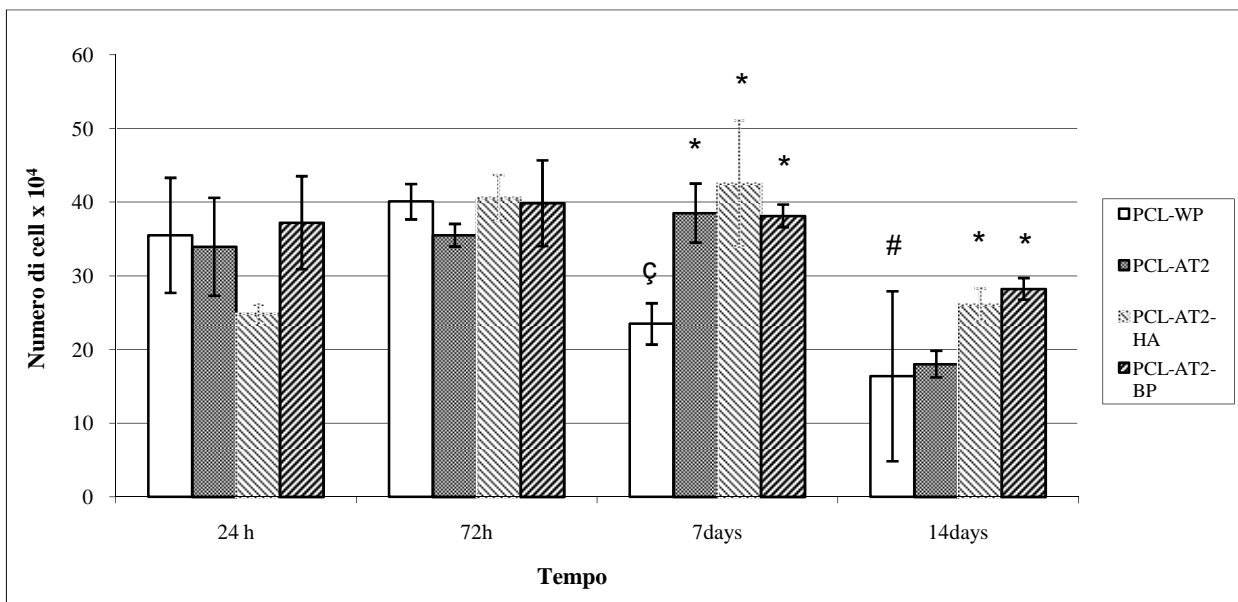


Figura 24A: Numero di cellule/cm² di MC3T3-E1 su scaffolds polimerici valutato con il saggio di vitalità MTS. Il dato è espresso come media \pm SD di tre esperimenti simili. Significatività statistica: *p < 0.05 rispetto a PCL-WP, # p < 0.05 rispetto ad ogni scaffolds a 24 h, 72h, 7 giorni, ç p < 0.05 rispetto ad ogni scaffolds a 72h.

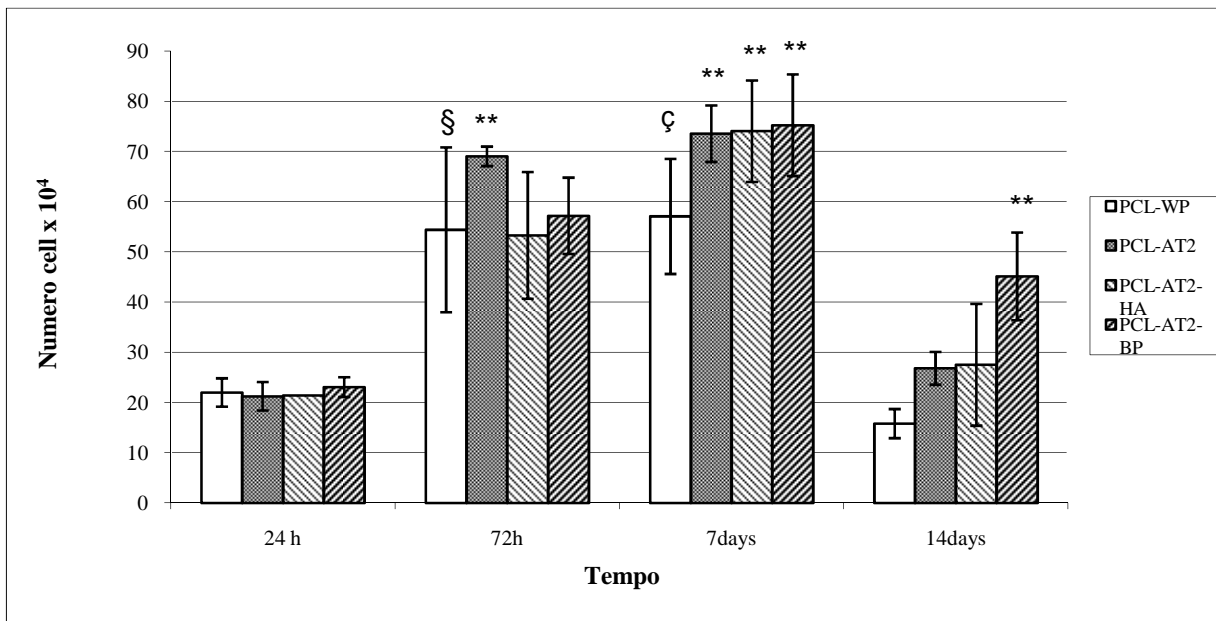


Figura 24B: Numero di cellule/cm² di MSC estratte da midollo osseo su scaffolds polimerici valutato con il saggio di vitalità MTS. Il dato è espresso come media \pm SD di tre esperimenti simili. Significatività statistica: ** $p < 0.05$ rispetto a PCL-WP, § $p < 0.05$ rispetto ad ogni scaffolds a 24h, ζ $p < 0.05$ rispetto ad ogni scaffolds a 72h.

Le cellule MC3T3-E1 seminate sulle matrici presentano un incremento nel loro numero fino ai 7 giorni dopo la semina tranne che per lo scaffold PCL-WP. Successivamente si è osservato un decremento a 14 giorni in ogni tipo di matrice. A 7 giorni dalla semina è stata valutata una differenza significativa nel numero di cellule tra PCL-WP e il resto delle matrici ($p < 0.05$). Dopo 14 giorni di coltura si è osservato un significativo decremento ($p < 0.05$) nella vitalità cellulare rispetto agli altri tempi di coltura da noi presi in considerazione.

La vitalità delle cellule MSC dopo 24 ore dalla semina è praticamente uguale su tutti gli scaffolds di policaprolattone. A 72 ore dalla semina si è osservata una significativa differenza del numero di cellule rispetto al dato delle 24 ore per tutti gli scaffolds, inoltre si è riscontrata una notevole differenza ($p < 0.05$) tra PCL-WP e PCL-AT₂. Dopo 7 giorni di coltura si osserva un aumento del numero di cellule negli scaffolds con porogeno rispetto a PCL-WP ($p < 0.05$) e anche rispetto alle 72 ore. Infine a 14 giorni si osserva un decremento della vitalità simile a quello delle popolazioni cellulari MC3T3-E1.

4.2 Morfologia cellulare

La morfologia cellulare per tutti e due i tipi cellulari (MC3T3-E1 e MSC) utilizzati in questo lavoro è stata valutata con la microscopia elettronica a scansione (Fig25A,B). Dopo 24 ore dalla semina entrambi le popolazioni cellulari sono adese su tutti gli scaffolds polimerici e appaiono appiattite e mostrano una forma irregolare ed allungata. La superficie di tutti i polimeri è completamente ricoperta di cellule dopo 7 e 14 giorni. Nelle matrici PCL-AT₂, PCL- AT₂-HA, PCL- AT₂-BP a 14 giorni è possibile osservare che le cellule hanno formato dei multilayers e sono penetrate all'interno dei pori con dimensioni maggiori (~ 100 µm), mentre nel PCL-WP si nota una drastica diminuzione delle cellule.

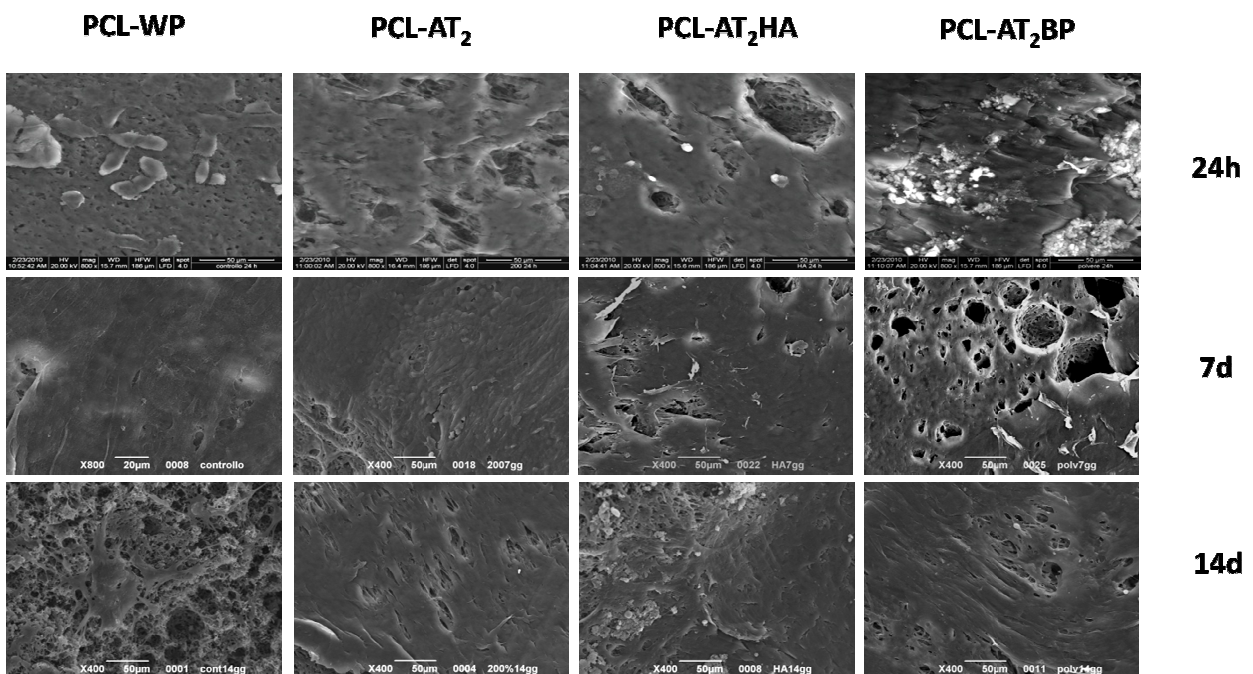


Figura 25A: Immagini SEM di MC3T3-E1 seminate su scaffolds di PCL a diversi time point (24 ore, 7 giorni, 14 giorni). Ingrandimento 400X.

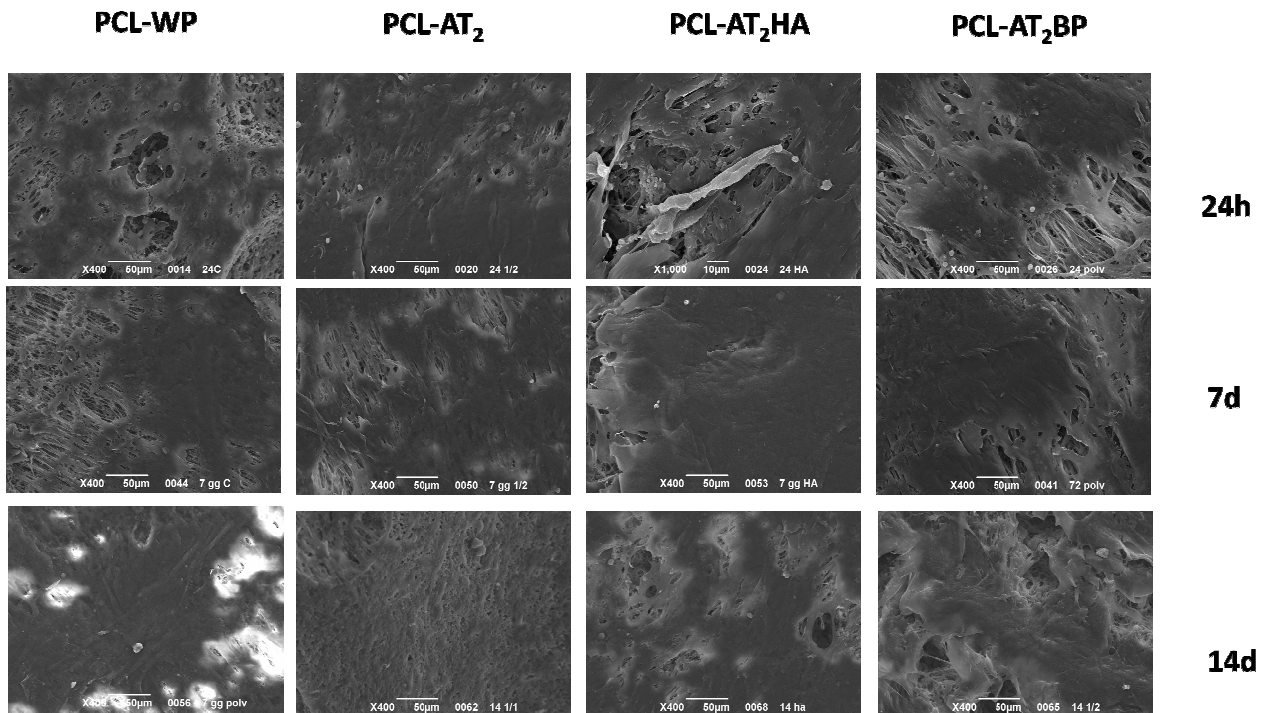


Figura 25A: Immagini SEM di MSC seminate su scaffolds di PCL a diversi time point (24 ore, 7 giorni, 14 giorni). Ingrandimento 400X.

5. Attività osteogenica (studi di differenziamento su PCL)

5.1 Attività della fosfatasi alcalina (ALP) in cellule MC3T3-E1

Dopo 7 giorni di trattamento l'attività dell'enzima ALP di cellule MC3T3-E1 era bassa in tutti i costrutti indipendentemente dalle condizioni di coltura (Fig 26A). A 14 giorni dopo l'induzione, i livelli dell'espressione di fosfatasi alcalina erano notevolmente aumentati, nei campioni stimolati con terreno osteogenico comparati con quelli non differenziati ($p < 0.05$). Inoltre nei costrutti differenziati PCL-AT₂, PCL-AT₂-HA, PCL-AT₂-BP è stata registrata una significativa differenza con PCL-WP ($p < 0.05$) (Fig 26B).

Sebbene l'attività dell'ALP fosse significativamente diminuita in tutti i costrutti a 21 giorni di coltura, gli scaffolds PCL-AT₂-HA, PCL-AT₂-BP sotto stimolazione osteogenica mostrano una significativa differenza ($p < 0.05$) nell'espressione dell'enzima, in confronto a PCL-WP (Fig 26C).

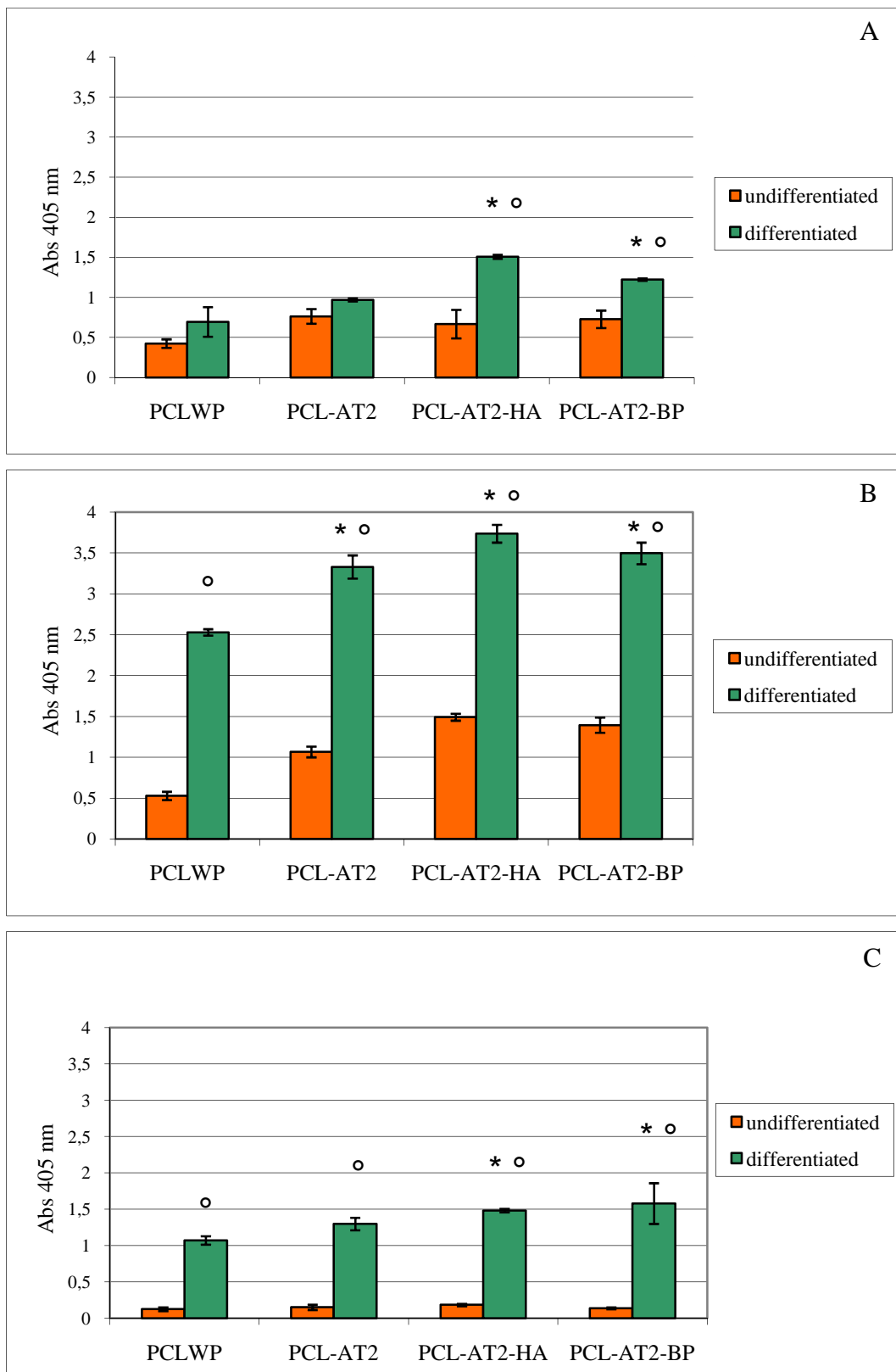
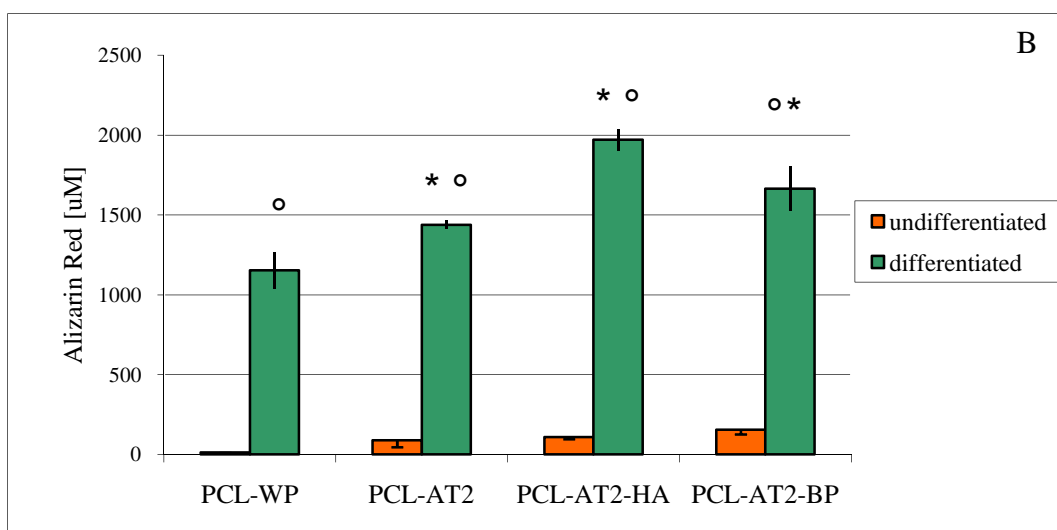
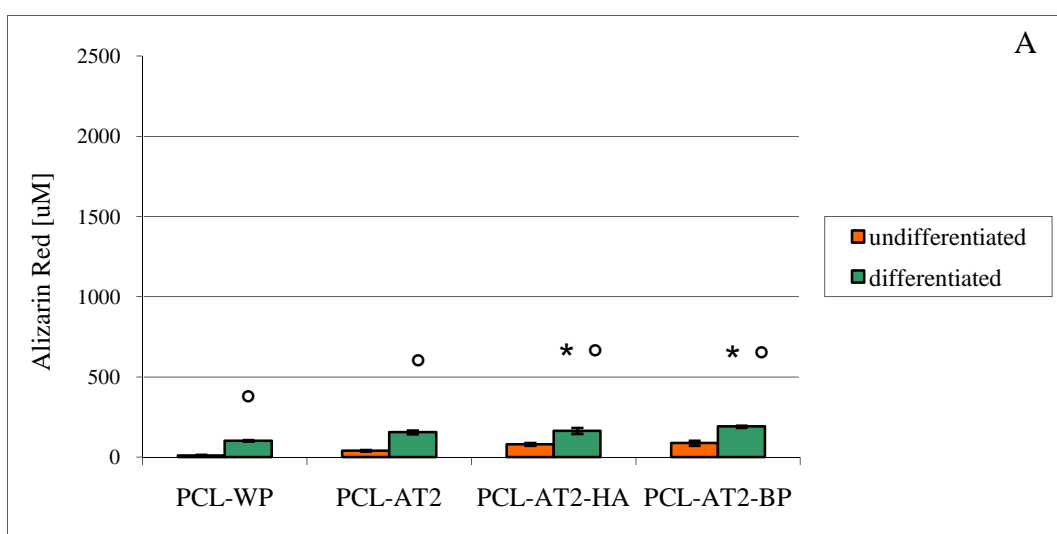


Figura 26:Espressione di fosfatasi alcalina su cellule MC3T3-E1 seminate su scaffolds di PCL, dopo 7 giorni (A), 14 giorni (B) e 21 giorni (C) dopo induzione osteogenica. ° $p < 0.05$ rispetto al controllo indifferenziato per ogni tipologia di polimero, * $p < 0.005$ rispetto al campione PCL-WP differenziato.

5.2 Saggio di mineralizzazione in vitro in cellule MC3T3-E1

Come mostrato in Fig 27, i depositi di sali di calcio delle popolazioni cellulari coltivate in condizioni differenziali erano maggiori rispetto a PCL-WP dopo 14 giorni di trattamento, e il loro valore aumentava progressivamente a 21 giorni di coltura. Inoltre si è osservata un differenza statistica significativa in tutti i costrutti in condizioni osteogeniche rispetto ai campioni trattati con terreno proliferativo ($p < 0.05$). Le cellule MC3T3-E1 su PCL-AT₂-HA e PCL-AT₂-BP, stimulate con terreno osteogenico, sono in grado di produrre matrice mineralizzata a 14 e 21 giorni con una differenza significativa se comparate con le popolazioni su PCL-WP ($p < 0.05$).



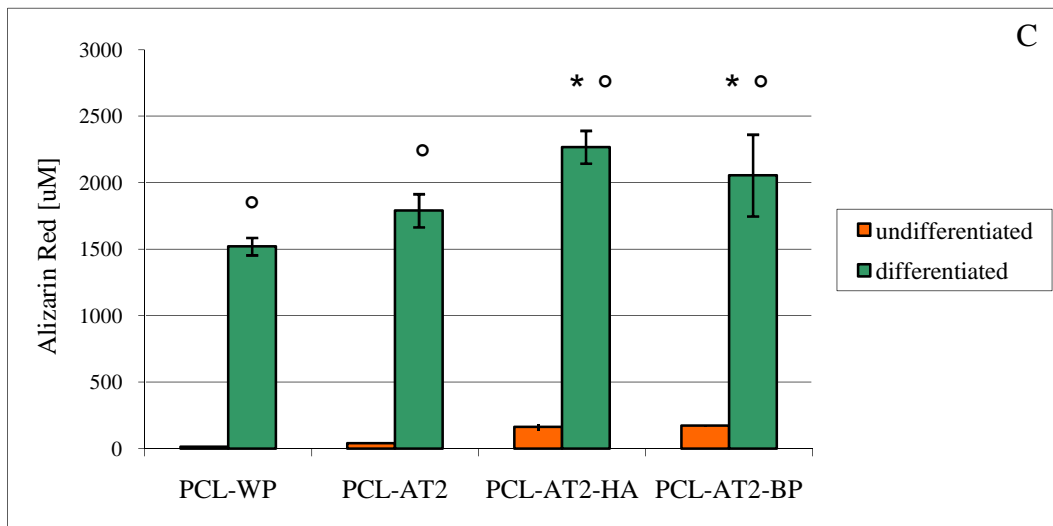


Figura 27: Quantificazione dei depositi di calcio attraverso Alizarin Red staining a 7 giorni (A), 14 giorni (B), 21 giorni (C) di differenziamento di cellule MC3T3-E1 seminate su scaffolds di PCL. I valori riportati sono le medie di tre esperimenti indipendenti. ° $p < 0.05$ rispetto al controllo indifferenziato per ogni tipologia di polimero, * $p < 0.05$ rispetto al PCL-WP differenziato.

5.3 RT-PCR di cellule MSC da midollo osseo di coniglio su PCL

L'analisi RT-PCR ha evidenziato che dopo 7 giorni di coltura le cellule MSC seminate su scaffolds di PCL, presentavano positività per β -actina, collagene di tipo I, e per osteopontina nei campioni differenziati con terreno osteogenico, ma anche nei campioni indifferenziati (Fig 28A). La situazione dopo 14 giorni dalla semina è diversa, in quanto le MSC presentano l'espressione di RUNX-2 indipendentemente dalle condizioni di coltura, e continuano a presentare positività per i marker descritti in precedenza. Inoltre dopo 14 giorni, è stata osservata l'espressione di osteocalcina in tutti i campioni trattati con terreno differenziativo, mentre era assente nei campioni indifferenziati (Fig 28B).

La situazione a 21 giorni di coltura era pressoché identica a quella osservata a 14 giorni. Dove si è riscontrato nuovamente che l'osteocalcina è presente solo nei campioni differenziati con terreno osteogenico. (Fig 28C).

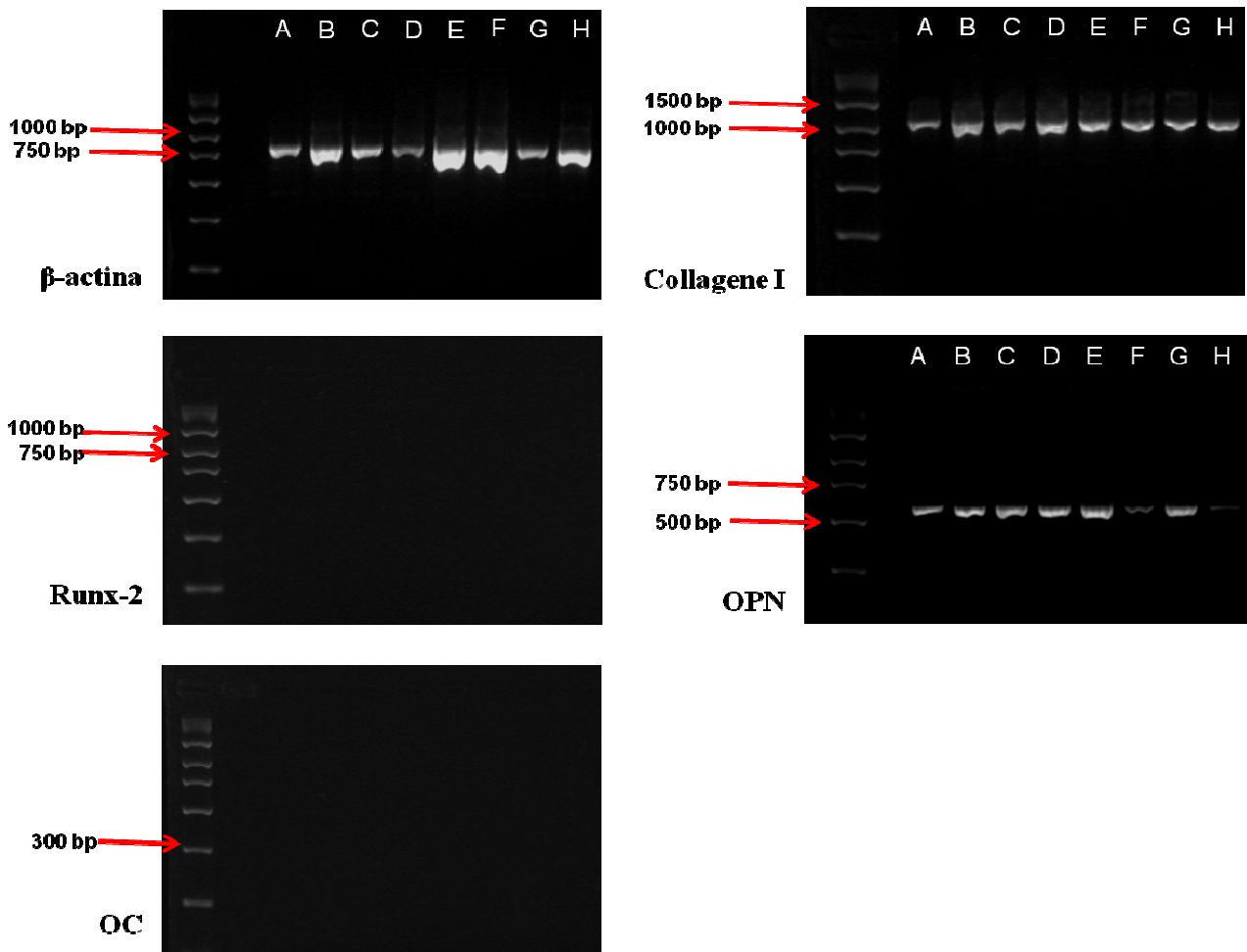


Figura 28A: Analisi RT-PCR della espressione di mRNA dopo 7 giorni di coltura di β -actina, collagene I, Runx-2, ostopontina, osteocalcina. **A:** PCL-WP indifferenziato, **B:** PCL-WP differenziato, **C:** PCL-AT₂ indifferenziato, **D:** PCL-AT₂ differenziato, **E:** PCL-AT₂-HA indifferenziato, **F:** PCL-AT₂-HA differenziato, **G:** PCL-AT₂-BP indifferenziato, **H:** PCL-AT₂- BP differenziato.

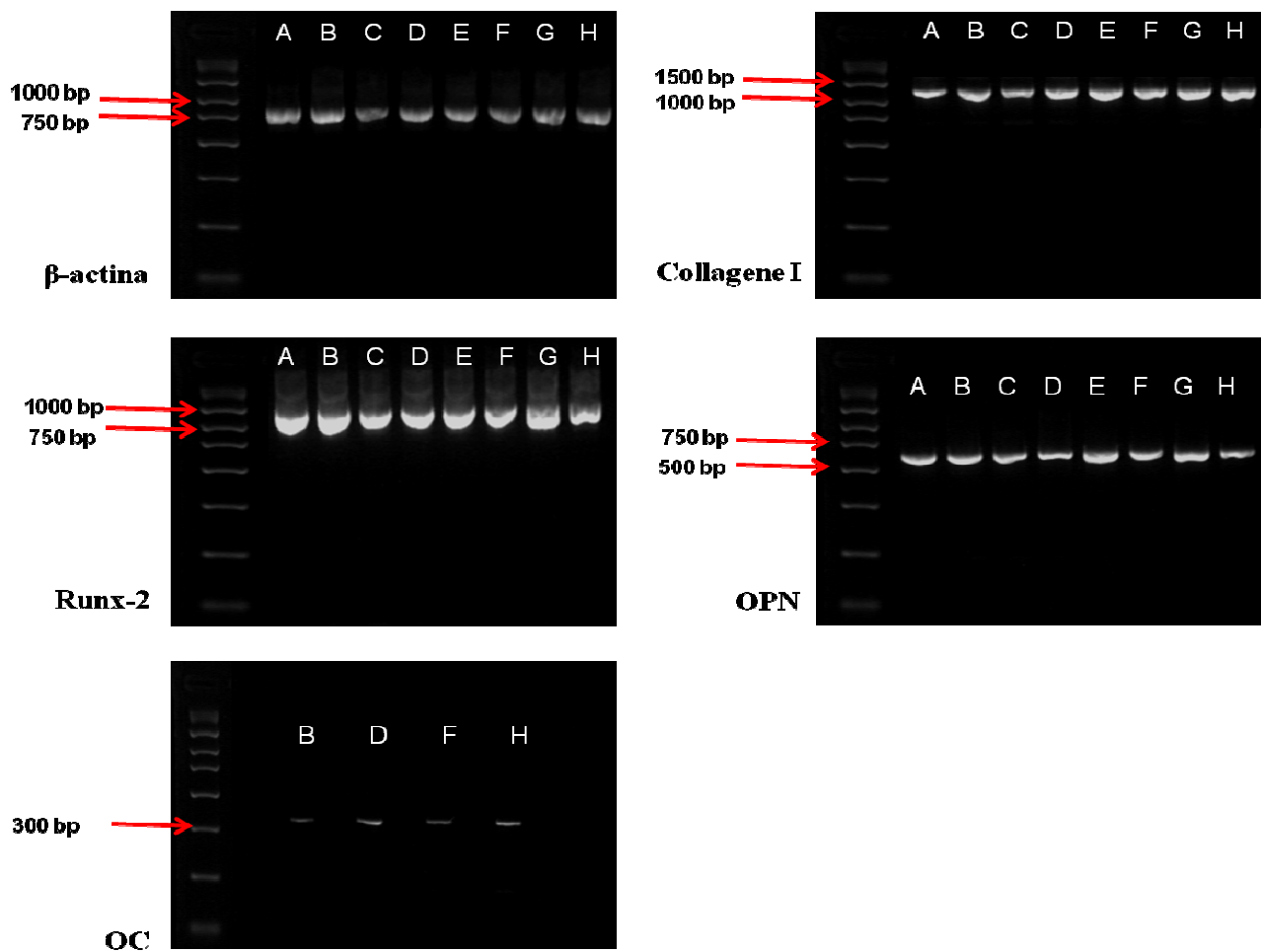


Figura 28B: Analisi RT-PCR della espressione di mRNA dopo 14 giorni di coltura di β -actina, collagene I, Runx-2, ostopontina, osteocalcina. **A:** PCL-WP indifferenziato, **B:** PCL-WP differenziato, **C:** PCL-AT₂ indifferenziato, **D:** PCL-AT₂ differenziato, **E:** PCL-AT₂-HA indifferenziato, **F:** PCL-AT₂-HA differenziato, **G:** PCL-AT₂-BP indifferenziato, **H:** PCL-AT₂-BP differenziato.

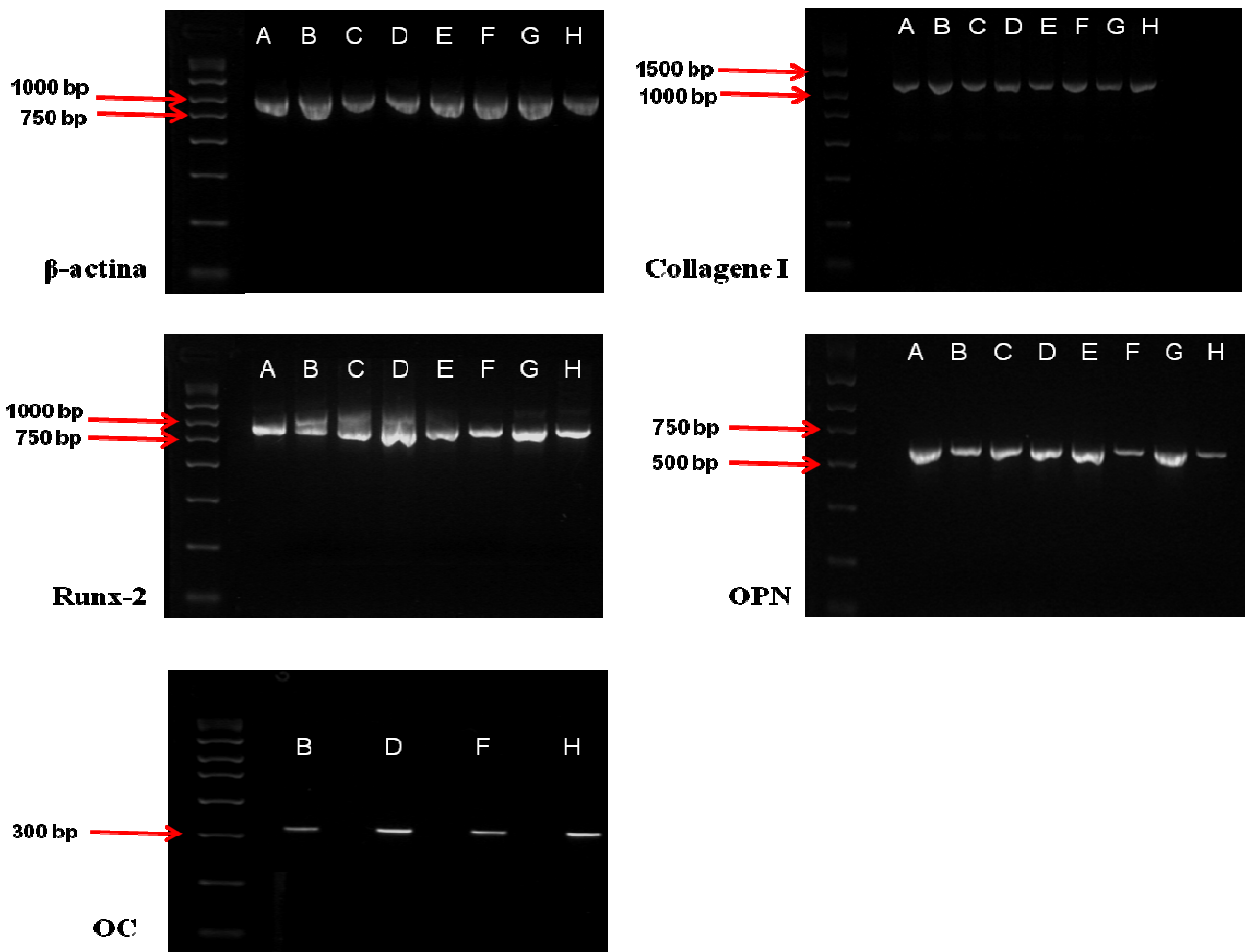


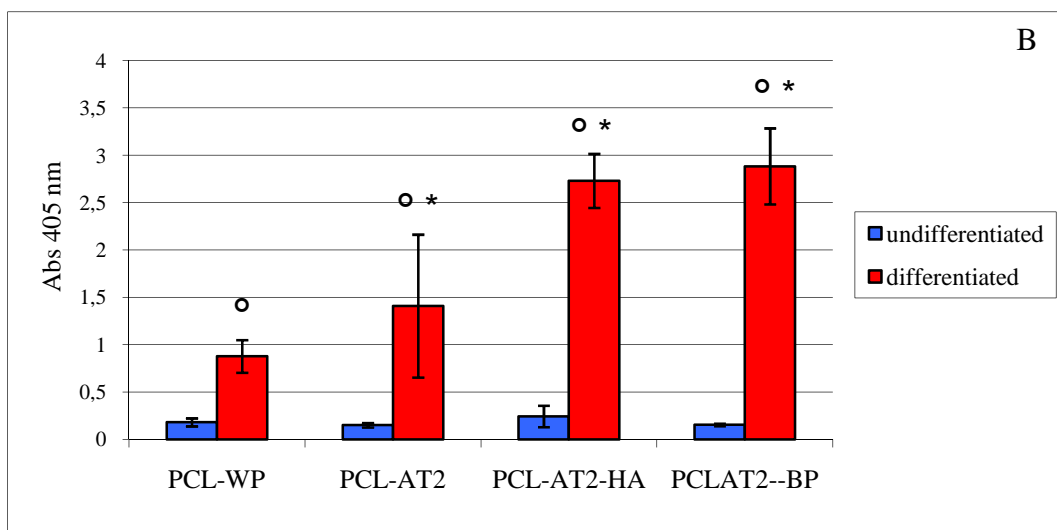
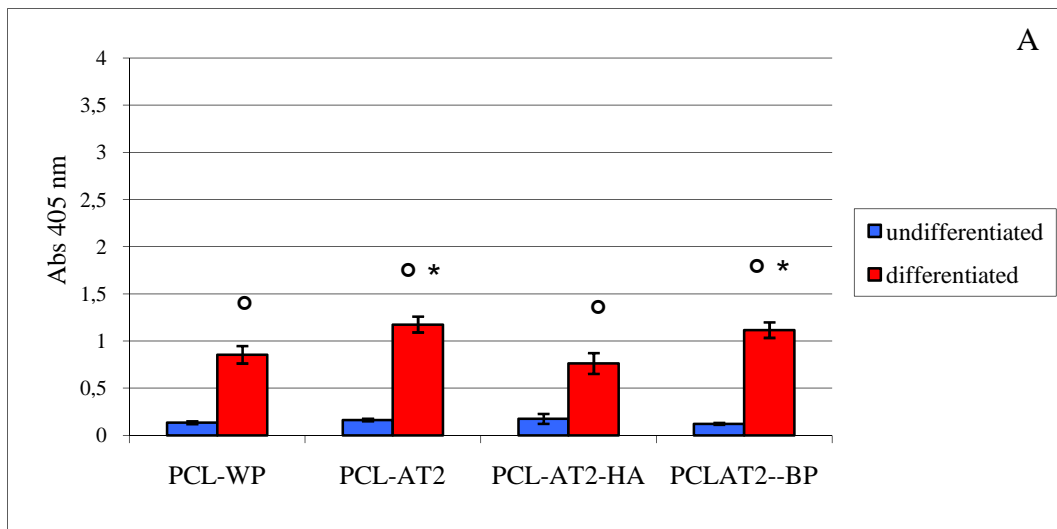
Figura 28C: Analisi RT-PCR della espressione di mRNA dopo 21 giorni di cultura di β -actina, collagene I, Runx-2, ostopontina, osteocalcina. **A:** PCL-WP indifferenziato, **B:** PCL-WP differenziato, **C:** PCL-AT₂ indifferenziato, **D:** PCL-AT₂ differenziato, **E:** PCL-AT₂-HA indifferenziato, **F:** PCL-AT₂-HA differenziato, **G:** PCL-AT₂-BP indifferenziato, **H:** PCL-AT₂-BP differenziato.

5.4 Attività della fosfatasi alcalina (ALP) in cellule MSC da midollo osseo di coniglio

Le popolazioni di cellule mesenchimali staminali seminate sulle matrici di PCL presentano un profilo di espressione di ALP simile alle MC3T3-E1, dopo 7 giorni di induzione differenziativa i livelli di enzima erano bassi in tutti gli scaffolds, mentre nei campioni non trattati l'espressione enzimatica era pressoché nulla (Fig 29A).

A 14 giorni dopo il trattamento si nota un importante aumento dell'espressione di ALP in modo particolare nelle matrici PCL-AT₂-HA e PCL-AT₂-BP rispetto a PCL-WP, tale differenza è risultata essere statisticamente significativa (p<0.05). Mentre la differenza tra PCL-AT₂ e PCL-WP non è significativa. I campioni non differenziati a 14 giorni di coltura presentavano valori simili rispetto ai 7 giorni.

Nelle matrici PCL-AT₂-HA e PCL-AT₂-BP a 21 giorni di trattamento osteogenico i livelli di fosfatasi alcalina erano leggermente aumentati rispetto a 14 giorni. Nei campioni PCL-AT₂ e PCL-WP si è registrato un marcato aumento dell'espressione di ALP significativamente statistico rispetto a 14 giorni (P<0,05) (Fig 29B). Infine nei campioni non differenziati anche dopo 21 giorni di coltura i livelli di fosfatasi alcalina sono rimasti decisamente bassi (Fig 29C).



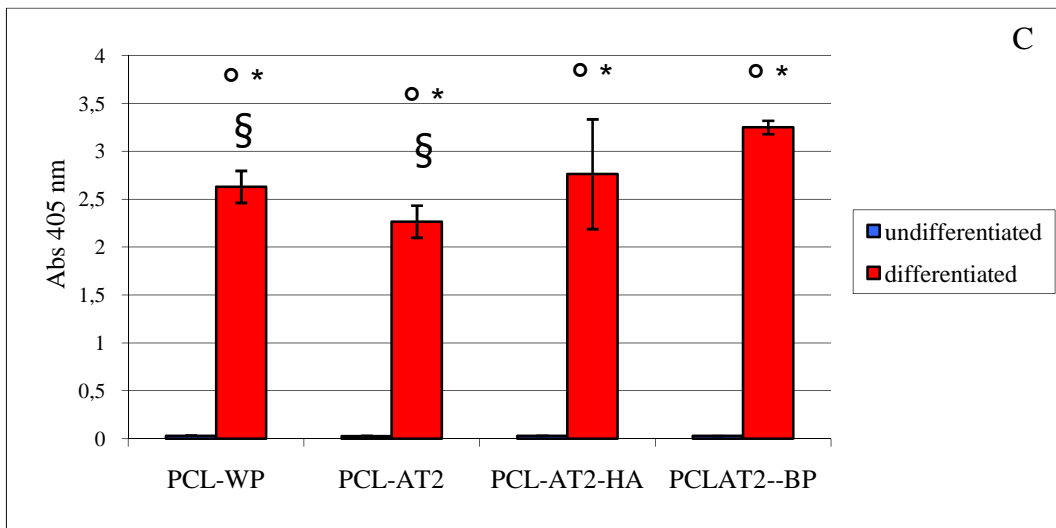


Figura 29: Espressione di fosfatasi alcalina su cellule MSC seminate su scaffolds di PCL, dopo 7 giorni (A), 14 giorni (B) e 21 giorni (C) dopo induzione osteogenica. ° $p < 0.05$ rispetto al controllo indifferenziato per ogni tipologia di polimero, * $p < 0.005$ rispetto al campione PCL-WP differenziato, § $p < 0.05$ rispetto ai 14 giorni per i campioni PCL-WP e PCL-AT₂ differenziati.

5.5 Saggio di mineralizzazione in vitro in cellule MSC da midollo osseo di coniglio

Il campione PCL-AT₂-HA dopo 7 giorni di induzione osteogenica presentava valori di sali di calcio molto maggiori rispetto agli campioni differenziati ($p < 0.05$), inoltre anche lo scaffolds PCL-AT₂-HA non differenziato presentava valori statisticamente significativi in confronto al resto dei polimeri analizzati ($p < 0.05$) (Fig 30A). A 14 giorni i valori dei depositi di calcio nei campioni trattati, erano quasi raddoppiati in PCL-AT₂-HA e PCL-AT₂-BP rispetto a 7 giorni, mentre in PCL-AT₂ l'aumento era più contenuto. Nel campione PCL-AT₂-HA non trattato i livelli del calcio erano leggermente diminuiti rispetto ai 7 giorni, ma sempre maggiori se confrontati con le altre matrici (Fig 30B)

Infine dopo 21 giorni, l'aumento di calcio ancora riscontrabile nei campioni realizzati con PCL-AT₂-HA e PCL-AT₂-BP con differenze importanti rispetto ai campioni non differenziati ($p < 0,05$), nel resto delle matrici i livelli erano simili ai 14 giorni (Fig 30C).

Come già trovato a 14 giorni il campione PCL-AT₂-HA non trattato possedeva valori maggiori agli altri campioni ($p < 0.05$).

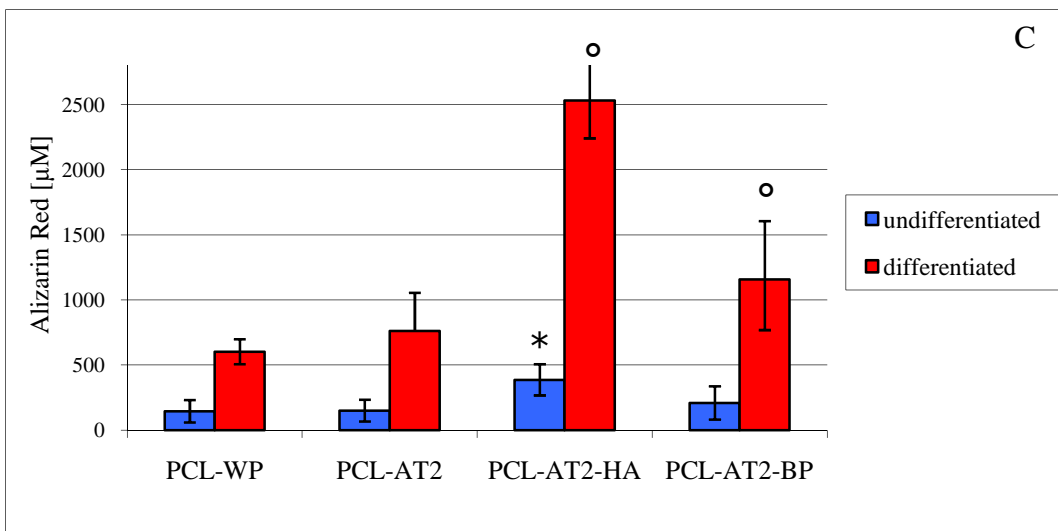
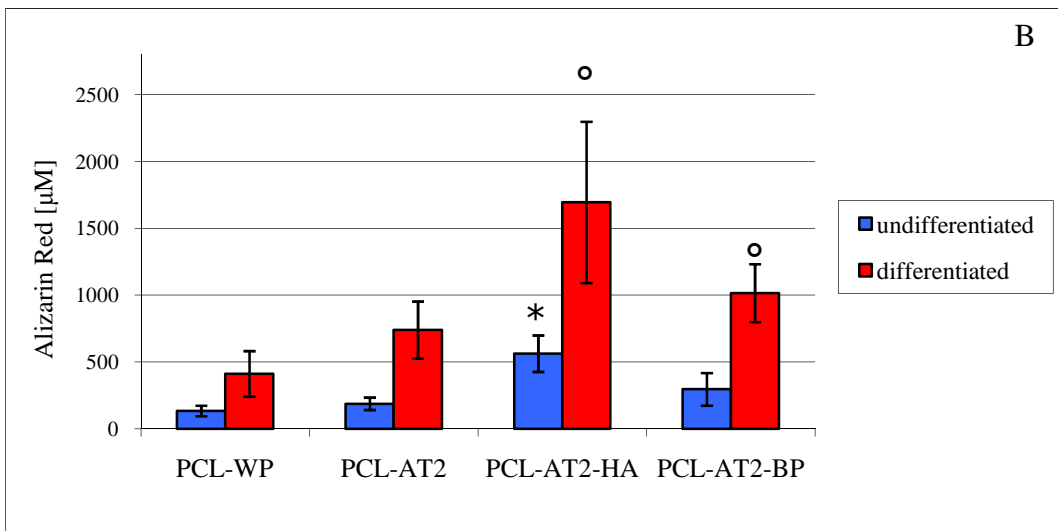
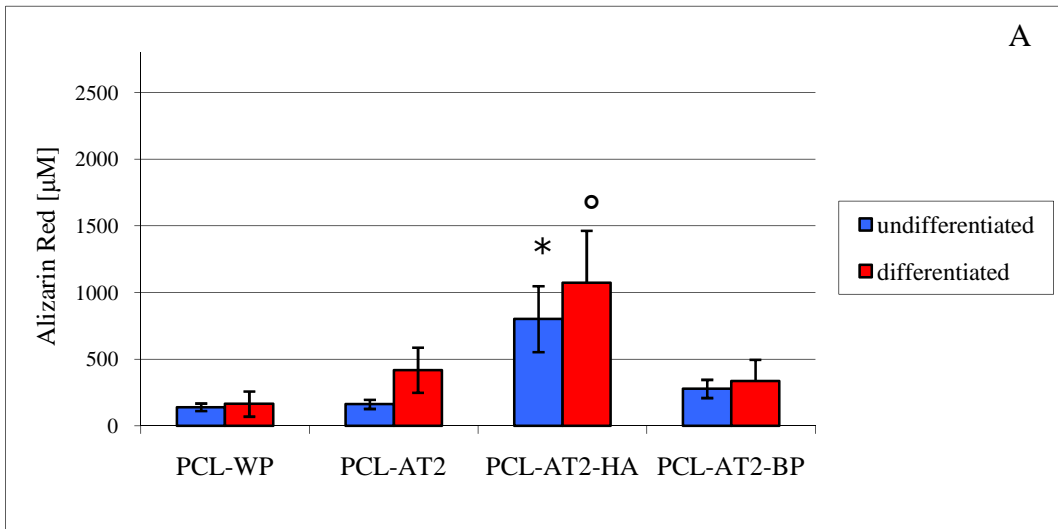


Figura 30: Quantificazione dei depositi di calcio attraverso Alizarin Red staining a 7 giorni (A), 14 giorni (B), 21 giorni (C) di differenziamento di cellule MSC seminate su scaffolds di PCL. I valori riportati sono le medie di tre esperimenti indipendenti. ° $p < 0.05$ rispetto al controllo indifferenziato per ogni tipologia di polimero, * $p < 0.05$

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il grado di successo nello sviluppo di un sostituto osseo attraverso l'ingegneria dei tessuti dipende fortemente dalle proprietà fisiche e meccaniche dello scaffold, il quale dovrà garantire un supporto strutturale e favorire l'adesione e la crescita di popolazioni cellulari (Causa et al., 2005). La porosità delle strutture ossee è stata largamente esaminata in modo tale da poter realizzare dei sostituti di origine sintetica con una struttura adeguata tale da permettere la completa rigenerazione del tessuto osseo lesionato (Lebourg et al., 2008). In base agli studi eseguiti da Hulbert et al., la dimensione minima dei pori richiesta per uno scaffold da impiegare per la rigenerazione ossea è di 100 μm e con una porosità totale compresa tra 80-90% (Freed et al., 1994). Per contro ulteriori studi hanno dimostrato che pori di dimensioni maggiori ($> 300 \mu\text{m}$) (Kuboki et al., 2001) migliorano l'osteogenesi diretta, mentre pori più piccoli sostengono l'ossificazione osteocondrale. La presenza di pori di 5-15 μm di diametro può essere utile per promuovere la neovascolarizzazione (Klawitter et al., 1971), mentre la dimensione dei pori compresa tra i 15-50 μm consente una ottimale distribuzione dei nutrienti (Cerroni et al., 2002). Le proprietà meccaniche dello scaffold dipendono dalla dimensione dei pori e da altri fattori, tra cui la composizione chimica del biomateriale e la sua velocità di degradazione. Matrici polimeriche realizzate a partire da biomateriali con un elevato tasso di degradazione e con elevata porosità (90%), non sono da ritenersi adatti alla rigenerazione tessutale ossea, in quanto avviene rapidamente la degradazione del materiale, compromettendo così l'integrità meccanica e strutturale prima della sostituzione con tessuto osseo neoformato. (Karageorgiou et al., 2005). Per assicurare un adeguato supporto meccanico con sufficiente resistenza e rigidità per la rigenerazione ossea, lo scaffold deve avere un tempo di degradazione in vivo di almeno 6 mesi (Hutmacher 2000).

In questo lavoro di tesi, il materiale utilizzato è stato il poli- ϵ caprolattone (PCL) un poliestere alifatico lineare, biodegradabile, biocompatibile con basso punto di fusione e buona solubilità nella maggior parte dei solventi (Zein et al., 2002, Coombes et al., 2003, Ciardelli et al., 2005). Tale polimero è approvato dalla Food and Drug Administration (FDA) per la preparazione di dispositivi biomedici come cateteri uretrali, sistemi di drug delivery e punti di sutura riassorbibili (Domb et al., 1997) inoltre è stato proposto come materiale per l'ingegneria tessutale dell'osso e della cartilagine (Benoit et al., 1999, Rohner et al., 2003). Grazie alle sue caratteristiche di idrofobicità e cristallinità, l'entrata di liquidi biologici all'interno del PCL è ostacolata, pertanto la degradazione chimica è

notevolmente ritardata, evitando così l'accumulo di sostanze che possono far insorgere un processo infiammatorio (Pitt 1990). Il lungo tempo di degradazione di PCL in vivo circa 24 mesi, è una proprietà desiderabile per un biomateriale destinato ad essere utilizzato come sostituto osseo (Kweon et al., 2003, Coombes et al., 2003, Ciardelli et al., 2005).

Lo scopo dello studio è stato quello di realizzare uno scaffold polimerico tridimensionale con porosità definita, buone proprietà meccaniche che permettano l'adesione, la crescita e il differenziamento di preosteoblasti e di cellule mesenchimali staminali da midollo osseo attraverso l'utilizzo di una metodica riproducibile e facile da realizzare.

La tecnica dell'inversione di fase, utilizzata in questo studio, ha dimostrato di essere molto flessibile, utile ed economica per realizzare scaffold 3D per applicazioni in ingegneria tessutale dell'osso. Il gel polimerico che si ottiene attraverso questa metodica può essere plasmato in qualsiasi forma e dimensione (Hua et al., 2002, Shin et al., 2005). L'inversione di fase permette di ottenere matrice con microporosità (1-20 μm) che dipende dal rapporto tra THF (buon solvente per PCL) e acqua (cattivo solvente) e una macroporosità (20-500 μm) ottenuta aggiungendo alla fase gel un materiale insolubile (porogeno) con delle dimensioni definite. Il porogeno in uno step successivo verrà rimosso con opportuna procedura di lavaggio.

Il solvente organico (THF) da noi utilizzato in questo lavoro per la solubilizzazione del PCL è citotossico (Mikos et al., 2000), e di conseguenza è stato rimosso dallo scaffold prima della semina cellulare, attraverso lavaggi con etanolo assoluto freddo. Usando l'analisi CG-MS noi abbiamo dimostrato che dopo tre lavaggi con etanolo, tutto il solvente residuo era stato completamente rimosso dagli scaffolds.

Le matrici di PCL ottenute senza l'aggiunta di nessun porogeno (PCL-WP), mostravano una porosità totale del 70% quando essa era valutata con il metodo della densità, ma solo del 21% quando era calcolata attraverso l'utilizzo dell'analisi MicroCT. Questi risultati assai diversi tra di loro possono essere spiegati considerando che utilizzando il metodo della densità è possibile rilevare la presenza di micropori con dimensioni tra 5-10 μm , un range chiaramente al di sotto del threshold dello strumento MicroCT, il quale rileva solo pori con diametro superiore a 10 μm . La stessa conflittualità nei valori di porosità ottenuti con i due metodi è stata riscontrata anche nei polimeri PCL-AT₁, PCL-AT₂, PCL-AT₂-HA, PCL-AT₂-BP. Utilizzando singolarmente quattro differenti porogeni (PEG-1000, saccarosio, fruttosio e alginato di calcio), abbiamo cercato di introdurre una struttura macroporosa negli scaffolds di PCL in modo tale da renderli più adatti per applicazioni nella rigenerazione ossea. L'aggiunta del porogeno PEG-1000 ha portato

all'ottenimento di matrici con una distribuzione regolare dei pori, i quali possedevano un diametro compreso tra 10-50 μm come osservato al SEM. Il diametro dei pori era notevolmente inferiore a quello da noi atteso, e non adatto ad applicazioni in ingegneria tessutale ed è riconducibile probabilmente alla co-solubilità di PCL e PEG-100 in THF. La rimozione dei porogeni come saccarosio, fruttosio e alginato di calcio, dallo scaffold attraverso lavaggi con etanolo e poi acqua/tampone fosfato porta alla formazione dei macropori ottenendo in questo modo una struttura porosa. Utilizzando saccarosio e fruttosio, le dimensioni dei macropori ottenuti all'interno dello scaffold sono risultati essere sempre molto inferiori alle dimensioni del porogeno aggiunto alla fase gel. Per esempio quando si è aggiunto saccarosio con particelle di diametro compreso tra 180-400 μm si sono ottenuti scaffolds con macropori con un diametro medio di 50 μm molto inferiore a quello delle particelle di partenza. Lo stesso problema è stato osservato anche con l'uso del fruttosio, dove utilizzando sfere con diametro di 150-400 μm si sono ottenuti dei macropori con dimensioni comprese tra 50-200 μm . Questo effetto potrebbe essere spiegato considerando la parziale solubilità di saccarosio e fruttosio nel fase gel la quale contiene acqua. Inoltre la metodica che vede l'utilizzo del fruttosio, non è riproducibile in quanto si sono ottenute matrici con morfologia sempre diversa.

L'utilizzo di alginato di calcio in sfere e fili ha portato alla formazione di scaffolds con una distribuzione bimodale della porosità: pori grandi (50-250 μm) e piccoli (5-10 μm), e una porosità totale compresa tra 72% e 79% valutata con il metodo della densità. In base ai dati forniti dall'analisi SEM e della porosità, abbiamo considerato che gli scaffolds di PCL con l'aggiunta di alginato di calcio in sfere e fili possiedano una migliore struttura porosa rispetto al resto delle matrici analizzate. Un biomateriale per favorire la crescita delle cellule al proprio interno richiede una interconnessione tra i pori, i quali a loro volta devono essere di dimensioni appropriate. I nostri dati dimostrano che solo gli scaffolds realizzati con i fili di Ca^{2+} alginato mostrano una appropriata interconnessione dei macropori in confronto al resto delle matrici. Sulla base di tali dati abbiamo realizzato matrici PCL-AT₂ con l'aggiunta di idrossiapatite e polvere d'osso per migliorare le proprietà fisiche degli scaffolds e per incrementare adesione e proliferazione delle cellule (Mikos et al., 2000). In questo lavoro è stato osservato come la porosità totale valutata con Micro CT dipende dal rapporto PCL/porogeno e varia tra 21-56%, infatti PCL-WP presenta pori di dimensioni piccole le quali aumentano in modo proporzionale in PCL-AT₁ e PCL-AT₂. L'aggiunta di HA e BP sembra non influenzare in modo significativo la porosità. I dati di MicroCT hanno mostrato che PCL-AT₂ e gli scaffolds PCL-AT₂-HA, PCL-AT₂-BP presenta indici morfometrici (porosità, interconnettività, dimensioni e distribuzione di pori e trabecole) maggiormente simili all'osso trabecolare (Hildebrand et al., 1999), rispetto a PCL-WP e PCL-AT₁. In aggiunta PCL-AT₂, PCL-AT₂-HA,

PCL-AT₂-BP presentano una maggiore area superficiale, la quale stimola l'adesione e la crescita cellulare (Yang et al., 2001). Le prove meccaniche hanno evidenziato che tutte le matrici, tranne PCL-AT₁, hanno una massima deformazione attorno ai 3 Kg. La poca resistenza al carico, in tutte le matrici rispetto all'osso naturale è riconducibile alla scarsa presenza della componente minerale (idrossiapatite) la quale permette di avere un materiale più resistente. Le matrici PCL-WP, PCL-AT₂, PCL-AT₁ presentano un ricovero elastico abbastanza elevato, mentre si è riscontrato un valore basso per PCL-AT₂-HA, PCL-AT₂-BP, questo perché HA e BP rendono il polimero più rigido e meno elastico, cioè più simile all'osso naturale (Yu et al., 2008).

Le analisi di biocompatibilità (saggio MTS e SEM) eseguite su entrambe le popolazioni cellulari (MC3T3-E1 e MSC) da noi utilizzate in questo lavoro, hanno evidenziato come sia presente una maggiore vitalità cellulare negli scaffolds realizzati con fili di alginato come porogeno (PCL-AT₂-HA, PCL-AT₂-BP) rispetto a PCL-WP. La maggiore vitalità è conseguente alla presenza di pori i quali sono tra di loro interconnessi e ciò porta ad un maggiore scambio di nutrienti e ossigeno che favorisce la crescita cellulare e la rimozione dei prodotti di scarto (Klawitter et al., 1971, Domb et al., 1997, Cerroni et al., 2002). Il decremento osservato a 14 gg del numero di cellule sia per MC3T3-E1 che per MSC è riconducibile alle condizioni di coltura in vitro, problema facilmente superabile attraverso l'utilizzo di bioreattori i quali contribuiscono ad una migliore distribuzione di ossigeno e nutrienti. In aggiunta, per quanto riguarda MC3T3-E1 la diminuzione della vitalità potrebbe essere dovuta anche al ciclo cellulare dei preosteoblasti, i quali dopo aver raggiunto la massima confluenza possibile riducono la proliferazione ed iniziano il processo di differenziazione (Choi et al., 1996).

La capacità di differenziamento di MC3T3-E1 è stata valutata attraverso l'analisi quantitativa della fosfatasi alcalina e della mineralizzazione della matrice extracellulare, sugli scaffolds: PCL-WP, PCL-AT₂, PCL-AT₂-HA, PCL-AT₂-BP. L'espressione di ALP è significativamente maggiore negli scaffolds con HA e BP rispetto alle altre matrici analizzate già a partire dai 7 giorni dopo trattamento con terreno induttivo osteogenico. Il picco di espressione massima della fosfatasi alcalina è stato rilevato a 14 giorni di trattamento, ma negli scaffolds dove era presente una maggiore porosità, l'attività dell'enzima fosfatasi alcalina era notevolmente incrementata rispetto a PCL-WP. Infine a 21 giorni di trattamento l'espressione della fosfatasi alcalina è diminuita in quanto avviene lo spegnimento del gene e l'attivazione di altri geni per il proseguimento del differenziamento (Stein et al., 1993). Nei campioni in cui le cellule erano mantenute in coltura con terreno proliferativo, presentavano livelli basali di espressione della fosfatasi alcalina a tutti i time-point esaminati. La deposizione dei sali di calcio valutata attraverso il saggio quantitativo Alizarin Red, era sempre maggiore ($p < 0.05$) nei campioni in cui era presente l'agente porogeno rispetto a

PCL-WP a partire dai 14 giorni dopo il trattamento, e incrementava a 21 giorni. Questi risultati sono in accordo con Wang *et al* dove è riportato che pori con un diametro $> 150 \mu\text{m}$ facilitano la mineralizzazione interna durante la formazione dell'osso. Il differenziamento in senso osteogenico di progenitori mesenchimali in vitro, è un processo complesso che richiede una regolazione di tipo "up and down" di una serie di geni specifici (Komori 2010).

A seguito dell'induzione differenziativa, gli osteoblasti esprimono marcatori proteici diversi a seconda del loro livello di maturazione. Noi abbiamo esaminato la progressione del differenziamento osteogenico e la mineralizzazione di progenitori mesenchimali su PCL analizzando i livelli di espressione genica di caratteristiche proteine attraverso RT-PCR, l'attività di fosfatasi alcalina e i depositi di sali di calcio. L'analisi dell'espressione genica ha evidenziato che le cellule MSC esprimevano positività per collagene di tipo I e per osteopontina anche in condizioni di coltura basale oltre a quelle trattate con terreno osteogenico dopo 7-14-21 giorni di trattamento. RUNX-2 è un fattore di trascrizione per una specifica proteina: osteocalcina. Tramite RT-PCR abbiamo osservato che anche RUNX-2 era espresso da cellule MSC in condizioni basali a 14 e 21 giorni.

Pur essendo tutti e tre geni associati al differenziamento osteogenico primario, la loro espressione anche in MSC non trattate con terreno induttivo è da ricondurre alla provenienza delle cellule. Karoaz *et al.*, hanno dimostrato come cellule MSC prelevate da midollo osseo esprimano positività per marcatori osteogenici, miogenici e neurogenici in condizioni basali di coltura. Pertanto, può essere vero che MSCs siano in possesso di diverse caratteristiche immunofenotipiche, che spiegano il motivo per cui queste cellule possono facilmente differenziarsi in cellule delle ossa, cartilagini, muscoli e tessuti neurali. Coerentemente con questo, le cellule esprimono marker di precursori del mesoderma, endoderma ed ectoderma, indicando che esse possono differenziarsi in cellule di tre strati germinali in permissive condizioni di coltura in vitro.

Un profilo diverso invece è stato osservato per quanto riguarda l'osteocalcina, marker del differenziamento tardivo, la quale era espressa a partire dai 14 giorni solo nelle cellule MSC su scaffolds di PCL e trattata con terreno induttivo osteogenico. L'osteocalcina è una piccola proteina contenente 3-5 residui di GLA (acido carbossiglutammico) ed è stato ipotizzato che essa possa giocare un ruolo di inibizione della mineralizzazione in quanto ritenuta capace di legarsi allo ione calcio e di renderlo indisponibile per la combinazione con lo ione fosfato, inibendo così l'accrescimento dimensionale dei cristalli minerali (Donzelli *et al.*, 2007). Questa ipotesi è avvalorata dalla constatazione che l'osteocalcina abbonda nel tessuto osseo maturo ed è invece scarsa nel tessuto osseo in via di formazione. La sua espressione solo su cellule MSC su PCL trattate con fattori differenzianti indica che la popolazione cellulare ha assunto un lignaggio

osteoblastico in risposta agli stimoli differenziativi, questo perché l'osteocalcina non è espressa in MSC. Questi dati sono stati successivamente confermati attraverso l'attività di fosfatasi alcalina e i depositi di sali di calcio. L'attività di ALP era pressoché nulla nelle cellule MSC mantenute in proliferazione a tutti i time point analizzati, mentre l'attività della fosfatasi alcalina era notevolmente maggiore nei campioni differenziati, con un picco massimo di espressione 21 giorni di trattamento. Inoltre nei campioni PCL-AT₂-HA, PCL-AT₂-BP l'attività di ALP era maggiore sia rispetto a PCL-WP che a PCL-AT₂. Per quanto riguarda la quantificazione dei sali di calcio abbiamo osservato come già a partire da 7 giorni le cellule MSC su PCL-AT₂-HA mantenute in condizioni basali esprimano una significativa differenza ($p < 0,05$) nella produzione di calcio rispetto a quelle seminate sugli altri scaffolds, dato confermato anche a 14 e 21 giorni, ed è riconducibile al fatto che l'idrossiapatite abbia un effetto osteogenico sulle popolazioni cellulari anche senza l'aggiunta di ulteriori fattori (Causa et al., 2005). La deposizione dei sali di calcio da parte di cellule mesenchimali trattate con terreno differenziativo è stata osservata essere maggiore negli scaffolds con l'idrossiapatite e con la polvere d'osso con un picco rilevato a 21 giorni. Questi dati sono confrontabili con quelli riportati da *Franceschi, 1999* il quale descrive che la mineralizzazione della ECM inizia dopo 21 giorni di differenziamento.

La tecnica dell'inversione di fase utilizzata in questo lavoro ha permesso di realizzare un modello di falange umana in policaprolattone. Questo è stato possibile grazie alle caratteristiche della metodica, in quanto permette di ottenere un gel il quale può essere posto in uno stampo ed assumerne la forma. La falange da noi ottenuta presentava tutte le caratteristiche esterne dell'osso naturale.

In conclusione in questo studio abbiamo dimostrato di avere individuato un polimero (ϵ -policaprolattone) adatto per la realizzazione di uno scaffold da poter utilizzare nel campo dell'ingegneria tessutale ossea messo a punto una metodica di produzione riproducibile, facile da realizzare ed economica. La tecnica dell'inversione di fase ci ha permesso di realizzare scaffolds con una forma di falange umana e con la possibilità di ottenere una protesi ossea su misura. Sono stati realizzati scaffolds con indici morfometrici simili all'osso trabecolare naturale con utilizzo di alginato di calcio come porogeno, e capaci di permettere l'adesione, la proliferazione e il differenziamento di preosteoblasti di linea e cellule mesenchimali staminali. L'aggiunta di HA e polvere d'osso agli scaffolds polimerici, non influisce sulla porosità ma garantisce maggiore rigidità, inoltre ottimizzano la potenzialità osteogenica delle matrici.

BIBLIOGRAFIA

Weigel T, Schinkel G, Lendlein A. Design and preparation of polymeric scaffolds for tissue engineering. *Expert Rev Med Devices* Nov;3(6):835-851, 2006.

Yang S, Leong KF, Du Z, Chua CK. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. *Tissue Eng.* Dec;7(6):679-689, 2001.

Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* May 14;260(5110):920-926, 1993.

Weinand C, Pomerantseva I, Neville CM, Gupta R, Weinberg E, Madisch I, Shapiro F, Abukawa H, Troulis MJ, Vacanti JP. Hydrogel-beta-TCP scaffolds and stem cells for tissue engineering bone. *Bone.* Apr;38(4):555-563, 2006.

Bonfield W. Designing porous scaffolds for tissue engineering. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci.* Jan 15;364(1838):227-232, 2006.

Wei G, Ma PX. Polymer/ceramic composites scaffolds for bone tissue engineering. In: ma PX, Elisseeff J, editors. *Scaffolding in tissue engineering*. Boca raton (FL): CRC Press; 241-251, 2005

Ciapetti G, Ambrosio L, Savarino L, Granchi D, Cenni E, Baldini N, Pagani S, Guizzardi S, Causa F and Giunti A: Osteoblast growth and function in porous poly epsilon -caprolactone matrices for bone repair: a preliminary study. *Biomaterials* 24:3815-3824, 2003.

Lin AS, Barrows TH, Cartmell SH and Guldberg RE: Microarchitectural and mechanical characterization of orientedporous polymer scaffolds. *Biomaterials* 24:481–489, 2003.

Kneser U, Schaefer DJ, Polykandriotis E and Horch RE: Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view. *J Cell Mol Med* 10: 7-19, 2006.

Tabata Y. Biomaterial technology for tissue engineering applications. *J R Soc Interface*. Jun 6;6 Suppl 3:S311-24. 2009.

Stylios G, Wan T Giannoudis P: Present status and future potential of enhancing bone healing using nanotechnology. *Injury Int .J. Care Injured* 38S: S63-S74, 2007.

Banwart JC, Asher MA Hassanein RS: Iliac crest bone graft harvest donor site morbidity: a statistical evaluation. *Spine* 20:1055–1060, 1995.

Chouzouri G, Xanthos M. In vitro bioactivity and degradation of polycaprolactone composites containing silicate fillers. *Acta Biomater*. Sep;3(5):745-756, 2007.

Nishida J, Shimamura T. Methods of reconstruction for bone defect after tumor excision: a review of alternatives. *Med Sci Monit*.14: RA107-RA113, 2008.

Mistry AS, Mikos AG. Tissue engineering strategies for bone regeneration. *Adv Biochem Eng Biotechnol*.94:1-22, 2005.

Shin H, Jo H, Mikos A. Biomimetic materials for tissue engineering. *Biomaterials* 24 4353-4364, 2003.

Burg KJL, Porter S, Kellam J: Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials* 21:2347-2359, 2000.

Hautmacher DW: Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* 21:2529-2543, 2000.

Salgado AJ, Coutinho O, Reis RL: Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromol Biosci* 4:743-765, 2004.

Porter JR, Ruckh TT, Popat KC. Bone tissue Engineering: A review in bone Biomimetics and drug delivery strategies. *Biotechnol Prog.* Nov-Dec;25(6):1539-1560, 2009.

Spector M: Biomaterials-based tissue engineering and regenerative medicine solutions to musculoskeletal problems. *Swiss Medical Weekly* 136: 293-301, 2006.

Brunski J.B. Metals. In: Ratner B.D, Hoffman A.S, Schoen F.J et al., eds *Biomaterials Sciences: An Introduction to materials in Medicine*. New York: Academic Press, 37-50, 1996.

Hench LL. Ceramics, glasses, and glasses-ceramics. In: Ratner B.D, Hoffman A.S, Schoen F.J et al., eds *Biomaterials Sciences: An Introduction to materials in Medicine*. New York: Academic Press, 73-83, 1996.

Nishiguchi S, Kato H, Neo M, Oka M, Kim HM, Kokubo T, et al. Alkali- and heat-treated porous titanium for orthopedic implants. *J Biomed Mater Res* 54(2):198–208, 2001.

van den Dolder J, Farber E, Spauwen PH, Jansen JA. Bone tissue reconstruction using titanium fiber mesh combined with rat bone marrow stromal cells. *Biomaterials* 24(10):1745–1750, 2003.

Karageorgiou V, Kaplan D: Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* 26:5474-5491, 2005.

Hulbert SF, Young FA, Mathews RS, Klawitter JJ, Talbert CD and Steeling FH: Potential of ceramic materials as permanently implantable skeletal prostheses. *J Biomed. Res* 4: 433-456, 1970.

Rubin JP, Yaremchuk MJ. Complications and toxicities of implantable biomaterials used in facial reconstructive and aesthetic surgery: a comprehensive review of the literature. *Plast Reconstr Surg*;100(5):1336–1353, 1997.

LeGeros RZ. Properties of osteoconductive biomaterials:calcium phosphates. *Clin Orthop* 395: 81–98, 2002.

van Luyn MJ, van Wachem PB, Damink LO, Dijkstra PJ, Feijen J, Nieuwenhuis P. Relations between in vitro cytotoxicity and crosslinked dermal sheep collagens. *J Biomed Mater Res* 26(8): 1091–110,1992.

Kikuchi M, Suetsugu Y Tanaka J: Preparation and mechanical properties of calcium phosphate/copoly-L-lactide composites. *J Mater Sci Mater Med* 8:361-364, 1997.

Marra KG, Campbell PG, DiMilla PA, Kumta PN, Mooney MP, Szem JW and Weiss LE: Novel three-dimensional biodegradable scaffolds for bone tissue engineering. In: *Biomedical materials: drug delivery, implants, and tissue engineering. Proceedings of the Materials Research Society Symposium*. Neenan T, Marcolongo M Valentini RF (ed.) Material Research Society Boston, MA. Nov 5-9, pp155-160, 1999b.

Perrin, D.E., and English, J.P. Polyglycolide and polylactide. In: Domb, A.J., Kost, J., Wiseman, D.M., eds. Handbook of Biodegradable Polymers. New York: Harwood Academic Publishers, 3–27, 1997.

Middleton, J.C., Tipton, A.J. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials* 21 (23):2335-2346, 2000.

Pitt CG: Poly- ϵ -caprolactone and its copolymers. M. Chasin and Langer R (ed.) *Biodegradable Polymers as drug Delivery System*, New York, pp71-119, 1990.

Ceozzo K, Gaynor A, Shaffer L, Kojima K, Vacanti C.A, Stahl G:L: Polyglycolic acid induced inflammation: Role of hydrolysis and resulting complement activation. *Tissue engineering* 12(2):301-308, 2006.

Coombes AGA, Rizzi SC, Williamson M, Barralet JE, Downes S, Wallace WA: Precipitation casting of polycaprolactone for applications in tissue engineering and drug delivery. *Biomaterials* 25: 315-325, 2003.

Bezwada RS, Jamiolkowski DD, Lee I, Vishvaroop A, Persivale J, Treka-Benthin S, Ermeta M, Suryadevara J, Yang A, Liu S: Monocryl suture, a new ultra-pliable absorbable monofilament suture. *Biomaterials* 16:1141–1148, 1995.

Benoit MA, Baras B, Gillard J: Preparation and characterization of protein-loaded poly (ϵ -caprolactone) microparticles for oral vaccine delivery. *Int. J. Pharm* 184:105-115, 1999.

Rohner D, Huttmacher DW, Cheng TK, Oberholzer M, Hammer B: In vivo efficacy of bone-marrow-coated polycaprolactone scaffolds for the reconstruction of orbital defects in the pig. *J Biomed Mater Res B* 66:574 –580, 2003.

Ma G, Song C, Sun H, Yang J, Leng X: A biodegradable levonogestrel-releasing implant made of PCL/F68 compound as tested in rats and dogs. *Contraception* 74:141-147, 2006.

Sung HJ, Carson M, Johnson C, Galis ZS. The effect of scaffold degradation rate on three-dimensional cell growth and angiogenesis. *Biomaterials* 25: 5735-5742, 2004.

Petrie Aronin CE, Cooper JA, Sefcik LS, Tholpady SS, Ogle RC, Botchwey EA: Osteogenic differentiation of dura mater stem cells cultured in vitro on three-dimensional porous scaffolds of poly(epsilon-caprolactone) fabricated via co-extrusion and gas foaming. *Acta Biomater* 4:1187-1197, 2008.

Kweon HY, Yoo MK, Park IK, Kim TH, Lee HC, Lee HS, Oh JS, Akaike T Cho CS: A novel degradable polycaprolactone networks for tissue engineering. *Biomaterials* 24: 801-808, 2003.

Causa F, Netti PA, Ambrosio L, Ciapetti G, Baldini N, Pagani S, Martini D, Giunti A: Poly-ε-caprolactone/hydroxyapatite composites for bone regeneration: in vitro characterization and human osteoblast response. *J. Biomed Mater Res A* 76:151-162, 2005.

Lam CX, Hutmacher DW, Schantz JT, Woodruff MA, Teoh SH: Evaluation of polycaprolactone scaffold degradation for 6 month in vitro and in vivo. *J Biomed Mater Res* 90: 906-919, 2009.

Zein I, Hutmacher DW, Tan KC, Teoh SH: Fused deposition modeling of novel scaffolds architectures for tissue engineering applications. *Biomaterials* 23:1169-1185, 2002.

GroeneveldEH, van den Bergh JP, Holzmann P, ten Bruggenkate CM, Tuinzing DB, Burger EH. Mineralization processes in demineralized bone matrix grafts in human maxillary sinus floor elevations. *J Biomed Mater Res*;48(4):393–402, 1999.

Kaplan FS, Hayes WC, Keaveny TM, Boskey A, Einhorn TA, Iannotti JP. Form and function of bone. In: Simon SR, editor. *Orthopaedic basic science*. Rosemont: American Academy of Orthopaedic Surgeons; 128–184, 1994.

Keaveny TM, Morgan EF, Niebur GL, Yeh OC. Biomechanics of trabecular bone. *Annu Rev BiomedEng*;3:307–333, 2001.

Leon y Leon CA: New perspectives in mercury porosimetry. *Adv Colloid Interface Sci* 76–77:341–372, 1998.

Kuboki Y, Takita H, Kobayashi D, Tsuruga E, Inoue M, Murata M, Nagai N, Dohi Y and Ohgushi H: BMP-induced osteogenesis on the surface of hydroxyapatite with geometrically feasible and nonfeasible structures: topology of osteogenesis. *J BiomedMater Res* 39:190–199, 1998.

Story BJ, Wagner WR, Gaisser DM, Cook SD, Rust-Dawicki AM: In vivo performance of a modified CSTi dental implant coating. *Int J Oral Maxillofac Implants*13:749–757, 1998.

Hulbert SF, Young FA, Mathews RS, Klawitter JJ, Talbert CD, Steeling FH: Potential of ceramic materials as permanently implantable skeletal prostheses. *J Biomed. Res* 4: 433-456, 1970.

Freed LE, Vunjak-Novakovic G, Biron RJ, Eagles DB, Lesnoj DC, Barlow SK, Langer R: Biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering. *Biotechnology* 12: 689-693, 1994.

Yuan H, Kurashima K, de bruijn JD, Li Y, de groof K, Zhang X. A preliminary study on osteoinduction of two kinds of calcium phosphate ceramics. *Biomaterials* 20(19):1799-1806, 1999.

Takahashi Y, Tabata Y. Effect of the fiber diameter and porosity of non-woven PET fabrics on the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Biomater Sci Polym Ed*;15(1):41–57, 2004.

Jin QM, Takita H, Kohgo T, Atsumi K, Itoh H, Kuboki Y. Effects of geometry of hydroxyapatite as a cell substratum in BMP-induced ectopic bone formation. *J Biomed Mater Res*;51(3):491–499, 2000.

Kuboki Y, Jin Q, Kikuchi M, MamoodJ, Takita H. Geometry of artificial ECM: sizes of pores controlling phenotype expression in BMP-induced osteogenesis and chondrogenesis. *Connect Tissue Res*;43(2–3):529–534, 2002.

Mikos AG, Sarakinos G, Leite SM, Vacanti JP and Langer R: Laminated three dimensional biodegradable foams for use in tissue engineering. *Biomaterials* 14:323-330, 1993b.

Mikos AG, Thorsen AJ, Czerwonka LA, Bao Y, Langer R, Winslow DN and Vacanti JP: Preparation and characterization of poly(L-lactic acid) foams. *Polymer* 35:1068-1077, 1994.

Mikos AG, Bao Y., Cima LG, Ingber DE, Vacanti JP, Langer R: Preparation of Poly(glycolic acid) bonded fiber structures for cell attachment and transplantation. *Journal of Biomedical Materials Research* 27:183-189, 1993.

Mooney DJ, Baldwin DF, Suh NP, Vacanti JP, Langer R: Novel approach to fabricate porous sponges of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) without the use of organic solvents. *Biomaterials* 17:1417-1422, 1996a.

Chen F, Lee C.N, Teoh S.H. nanofibrous modification on ultra-thin poly(ϵ -caprolactone) membrane via electrospinning. *Materials Science and Engineering* .C27: 325-332, 2007.

Mikos AG and Temenoff JA: Formation of highly porous biodegradable scaffolds for tissue engineering. *EJB* 3: 1-6, 2000.

Hua FJ, Kim GE, Lee JD, Son YK , Lee DS: Macroporous poly(L-lactide) scaffold. 1. Preparation of macroporous scaffold by liquid-liquid phase separation of PLLA-dioxane-water system. *J. Biomed.Mater. Res*63: 161-167, 2002.

Shin KC, Kim BS, Kim JH, Park TG, Nam JD, Lee DS: A facile preparation of highly interconnected macroporous PLGA scaffolds by liquid-liquid phase separation II. *Polymer* 46: 3801-3808, 2005.

Amina F. Zebboudj, Minori Imura, and Kristina Bostrom Matrix GLA Protein, a Regulatory Protein for Bone Morphogenetic Protein-2. *The journal of biological chemistry* Vol. 277, No. 6, Issue of February 8, pp. 4388–4394, 2002.

Marks SC, Jr. Hervey DC. The structure and development of bone; in: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA. Eds. *Principles of Bone Biology*. Academic Press, San Diego: 3-14, 2001.

Yamaguchi A, Komori T, Suda T. Regulation of Osteoblast Differentiation Mediated by Bone Morphogenetic Proteins, Hedgehogs, and Cbfa1. *Endocr. Rev.* 21: 393-411, 2000.

Ducy P. Cbfa1: a molecular switch in osteoblast biology *Dev Dyn.* Dec;219(4):461-471, 2000.

Westendorf JJ, Kahler RA, Schroeder. Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases. *TM.Gene.* Oct 27;341:19-39, 2004.

Rawadi G, Roman-Roman S. Wnt signalling pathway: a new target for the treatment of osteoporosis. *Expert Opin Ther Targets.* Oct;9(5):1063-1077, 2005.

Ogawa E, Maruyama M, Kagoshima H, Inuzuka M, Lu J, Satake M, Shigesada K, Ito Y. PEBP2/PEA2 represents a family of transcription factors homologous to the products of the *Drosophila runt* gene and the human AML1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jul 15;90(14):6859-6863, 1993.

Mundlos S, Otto F, Mundlos C, Mulliken JB, Aylsworth AS, Albright S, Lindhout D, Cole WG, Henn W, Knoll JH, Owen MJ, Mertelsmann R, Zabel BU, Olsen BR. Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell* May 30;89(5):773-779, 1997.

Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B. The novel zinc finger-containing factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 1:17-29, 2002.

Stein GS, Lian JB. Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocrine Reviews* Vol14 N4,424-442, 1992.

Kodama H, Amagai H, Sudo S, Kasai S, Yamamoto S. establishment of clonal osteogenic cell line from newborn mouse calvaria. *Jpn.J.Oral.Biol* 23:899-901, 1981.

Dong SW, Ying DJ, Duan XJ, Xie Z, Yu ZJ, Zhu CH, Yang B, Sun JS. Bone regeneration using an acellular extracellular matrix and bone marrow mesenchymal stem cells expressing Cbfa1. *Biosci. Biotechnol. Biochem* 73 (10),2226-2233, 2009.

De Kork IJ, Peter SJ, Archambault M, van den Bos C, Kadyla S, Aukhil I, Cooper LF. Investigation of allogenic mesenchymal stem cell-based alveolar bone-formation: preliminary findings. *Clin.Oral.Implants Res* 14,481-489, 2003.

Tsuchida H, Hashimoto J, Crawford E, Manske P, Lou J. engineered allogenic mesenchymal stem cells repair femoral segmental defect in rats. *J.Orthop. Res* 21,44-53,2003.

Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Research & Therapy* 9,204, 2007.

Porter B, Zauel R, Stockman H, Guldberg R, Fyhrie D. 3-D computational modeling of media flow through scaffolds in a perfusion bioreactor. *J Biomech*;38(3):543–549, 2005.

Jones AC, Sakellariou A, Limaye A, Arns CH, Senden TJ, Sawkins T, et al. Investigation of microstructural features in regenerating bone using micro-computed Tomography. *J Mater Sci Mater Med*;15(4):529–532, 2004.

Wei G and Ma PX: Macroporous and nanofibrous polymer scaffolds and polymer/bone-like apatite composite scaffolds generated by sugar spheres. *J Biomed Mater Res A* 78:306-315, 2006.

Smidsrød O and Skjåk-Bræk G: Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends Biotechnol* 8:71-78, 1990.

Meezan E, Hjelle JT, Brendel K. A simple, versatile, non disruptive method for the isolation of morphologically and chemically pure basement membranes from several tissues. *Life Sci*, 17, 1721, 1975.

Hildebrand T, Laib A, Müller R, Dequeker J Rügsegger P: Direct three-dimensional morphometric analysis of human cancellous bone: Microstructural data from spine, femur, iliac crest, and calcaneus. *J Bone Miner Res* 14: 1167-1174, 1999.

Lebourg M, Sabater Serra R, Mas Estelles J, Hernandez Sanches F, Gomez Ribelles JL and Suay Anton J: Biodegradable polycaprolactone scaffold with controlled porosity obtained by modified particle-leaching technique. *J Mater Sci Mater Med* 19: 2047-2053, 2008.

Klawitter JJ and Hulbert SF: Application of porous ceramics for attachment of load-bearing internal orthopedic applications. *J. Biomed. Mater. Res. Symp* 2: 161, 1971.

Cerroni L, Filocamo R, Fabbri M, Piconi C, Caropeso S and Condò SG: Growth of osteoblast-like cells on porous hydroxyapatite ceramics: an in vitro study. *Biomolecular Engineering* 19: 119-124, 2002.

Ciardelli G, Chiono V, Vozzi G, Pracella M, Ahluwalia A, Barbani N, Cristallini C and Giusti P: Blends of poly (ϵ -caprolactone) and polysaccharides in tissue engineering applications. *Biomacromolecules* 6: 1961-1976, 2005.

Domb AJ, Kost J and Wiseman DM: In: *Handbook of Biodegradable Polymers*. Domb AJ, Kost J and Wiseman DM (ed.) Harwood Academic Publishers Amsterdam, 1997.

Yu H, Matthew HW, Wooley PH and Yang SY: Effect of Porosity and Pore Size on Microstructures and Mechanical Properties of Poly-ε-Caprolactone-Hydroxyapatite Composites. *Journal of biomedical materials research Part B* 86:541-547, 2008.

Choi JY, Lee BH, Song KB, Park RW, Kim IS, Sohn KY, Jo JS and Ryoo HM: Expression patterns of bone-related proteins during osteoblastic differentiation in MC3T3-E1 cells. *J Cell Biochem* 61:609-18, 1996.

Stein G, Lian J: Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocrine Reviews* Vol 14 N4 , 424-442, 1993.

Wang H, Li Y, Zuo Y, Li J, Ma S and Cheng L: Biocompatibility and osteogenesis of biomimetic nano-hydroxyapatite/polyamide composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*: 3338-3348, 2007.

Komori T: Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX-2. *Cell Tissue Res* 339:189-195, 2010.

Karoaz E, Aksoy A, Ayhan S, Sariboyaci A.E, Kaymaz F, Kasap M. Characterization of mesenchymal stem cells from rat bone marrow: ultrastructural properties, differentiation potential and immunophenotypic markers. *Histochem Cell Biol* 132:533–546, 2009.

Donzelli E, Salvadè A, Mimo P, Viganò M, Morrone M, Papagna R, Carini F, Zaopo A, Miloso M, Baldoni M, Tredici G. Mesenchymal stem cells cultured on a collagen scaffold: In vitro osteogenic differentiation. *Arch Oral Biol* 52(1):64-73, 2007.

Franceschi R.T. The developmental control of osteoblast-specific gene expression: role of specific transcription factors and the extracellular matrix environment. *Crit Rev Oral Biol Med* 10(1):40-57. Review, 1999.

RINGRAZIAMENTI

Al termine del mio dottorato di ricerca, è doveroso esprimere un ringraziamento a diverse persone, le quali con piccoli o grandi aiuti hanno permesso la realizzazione di questo lavoro.

Innanzitutto ringrazio il mio supervisore Prof. Claudio Grandi e il direttore della scuola di dottorato PierPaolo Parnigotto, i quali mi hanno dato la possibilità di lavorare a questo interessante progetto e per la disponibilità sempre manifestata nei miei confronti.

Un ringraziamento va alla Dott.ssa Rosa Di Liddo e alla Dott.ssa Silvia Baiguera le quali sono state indispensabili per l'ottenimento dei risultati, grazie al loro competenza, pazienza e disponibilità.

Un ringraziamento particolare va al Dott. Silvano Lora il quale grazie alla sua idea, ha fatto in modo di poter dare inizio a questo lavoro, inoltre i suoi consigli associati a quelli del Prof Daniele Dalzoppo, sono stati fondamentali per superare le difficoltà incontrate durante il percorso

Un ringraziamento speciale va alla Dott.ssa Chiara Giraudò e al Dott. Claudio Furlan per aver contribuito in modo importante al lavoro con le analisi alla MicroCT e al Microscopio elettronico a scansione e specialmente per la pazienza...

Il mio ringraziamento va a tutti i dottorandi conosciuti nel Laboratorio di biologia molecolare dell'Ospedale San Luca di Trecenta: Marco, Valentina, Giulia, Silvia, Rosa, Deborah, Denis, Alessia, Sasa, Silvia la cui compagnia ha reso più spensierate e divertenti le lunghe giornate in laboratorio, inoltre per me in questi anni, non sono solo stati dei colleghi ma anche dei sinceri amici su cui poter contare nei momenti di difficoltà.

Infine ringrazio i miei genitori che hanno sempre creduto in me e se oggi sono la persona che sono lo devo a loro, e tutti i miei amici che hanno condiviso con me questa esperienza.

Piergiorgio