



# AZIONE BIOTECH 2

## Biopolimeri naturali o sintetici da utilizzare come supporto nella rigenerazione ossea per la costruzione di protesi tridimensionali con procedimento stereolitografico

**Soggetto attuatore:** ATI, Università degli Studi di Padova (capofila), SAGA SpA (ob. A), Cutech srl (ob. B) e Azienda Sanitaria ULSS 18 RO

**Responsabile scientifico:** Prof. Claudio Grandi, Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università di Padova

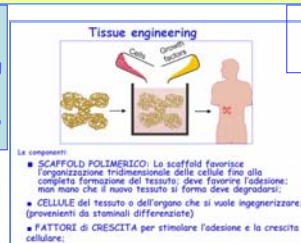
**Attività dell'ATI:** Trecenta (RO), Ospedale San Luca, Centro Interdipartimentale per la Biologia e la Medicina della Rigenerazione (Università di Padova) (Dir. Prof. P.P. Parnigotto)

**Il progetto di ricerca prevede due obiettivi:**

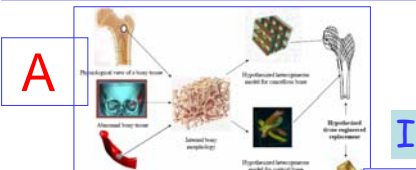
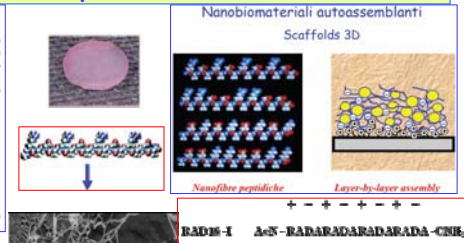
**A. progettazione in vitro di biopolimeri sintetici per la costruzione di bioprotesi tridimensionali ossee idonee all'applicazione in chirurgia maxillo-facciale e ortopedica.**

**B. realizzare un modello complesso di cute costituito da popolazioni cellulari preparate in Puramatrix Hydrogel e organizzate in uno strato basale di preadipociti, uno strato intermedio di fibroblasti/celleule endoteliali e uno strato superiore di cheratinociti.**

La ricerca, una continuazione dell'Az. BIOTECH 1, ha lo scopo di studiare le caratteristiche chimico-fisiche dello scaffold ed il ruolo che giocano nella realizzazione della bioprotesi. In particolare la porosità ha un ruolo primario nel garantire l'adesione e la crescita cellulare nonché la velocità di biodegradazione, le proprietà superficiali e quelle meccaniche. Ognuna di queste caratteristiche infatti devono essere definite in base alla tipologia di protesi da costruire.

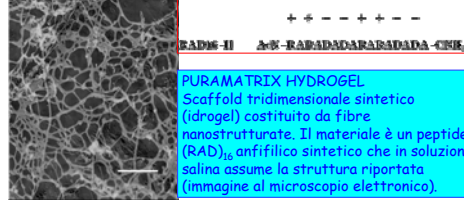


**INTRODUZIONE**  
Lo scopo della metodologia di cultura cellulare messa a punto da Cutech è stato quello di apparire consentendo la proliferazione, l'impaccatura e la caratterizzazione delle principali popolazioni cellulari che compongono la pelle umana (Fig. 1), in modo da costruire, in un prossimo futuro, un sistema tridimensionale di pelle da usare come modello sperimentale.  
Di seguito sono descritte le tecniche usate ed i risultati ottenuti nella manipolazione delle cellule dell'epidermide cheratinociti e del derma fibroblasti nonché i metodi per la loro caratterizzazione.

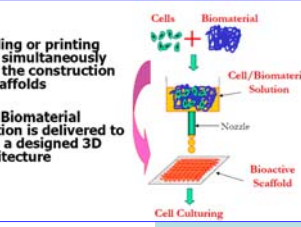


### In prospettiva ...

In questa ricerca di **BIONANOTECNOLOGIA** è stato sperimentato uno scaffold nanostrutturato in fase idrogel per realizzare un modello complesso di cute costituito da popolazioni cellulari preparate in Puramatrix Hydrogel e organizzate in uno strato basale di preadipociti, uno strato intermedio di fibroblasti/celleule endoteliali e uno strato superiore di cheratinociti.



**Scaffold materials:** Biocompatibility, Biodegradability, Biocompatibility  
**Scaffold porosity and pore size:**  
• A large surface area favors cell attachment and growth;  
• A large pore volume is to accommodate and deliver a sufficient number of cells;  
• High porosity is for the easy diffusion of nutrients, transport and for vascularization.  
5 µm for neovascularization,  
5-15 µm for fibroblast ingrowth,  
20 µm for the ingrowth of hepatocytes,  
40-125 µm for regeneration of adult skin,  
100-150 µm for osteoid ingrowth,  
100-350 µm for regeneration of bone,  
500 µm for fibrovascular tissue



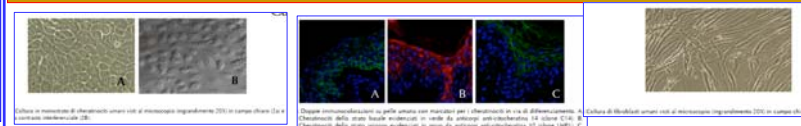
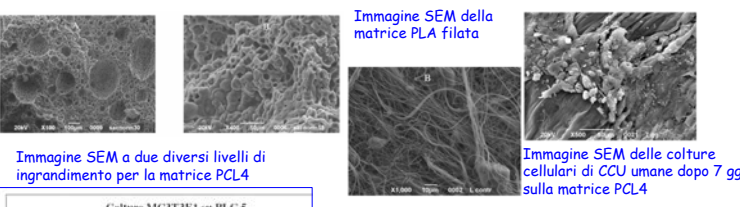
Lo schema sperimentale ha previsto l'estrazione delle popolazioni cellulari di preadipociti, fibroblasti, cellule endoteliali e cheratinociti da espianti umani di soggetti donatori di età compresa tra i 25 e 50 anni e la loro successiva incapsulazione nella soluzione di gel Puramatrix Hydrogel, preparata allo 0,25%. Studi di citotossicità e di differenziamento cellulare sono stati eseguiti per la caratterizzazione della crescita cellulare nel sistema 3D.

**PURAMATRIX HYDROGEL**  
Scaffold tridimensionale sintetico (idrogel) costituito da fibre nanostrutturate. Il materiale è un peptide (RAD)<sub>n</sub>, anfifilico sintetico che in soluzione salina assume la struttura riportata (immagine al microscopio elettronico).

# RISULTATI

La struttura portante della matrice proposta è stata ottenuta mediante uno scheletro polimerico di poli-caprolattone di peso molecolare (PM) pari a ~65 KDa; la porosità del supporto è stata ottenuta impiegando saccarosio (PM 342,30 Da) (condizione B) e polietilenglicole (PEG 1000) (condizione C), oltre che da diverse modalità sperimentali (condizione A). Le condizioni A e C hanno portato alla formazione di matrici caratterizzate da porosità variabile e non controllabile (diametro di pori ~1x10-3-1 mm); la procedura B ha garantito una micro e macroporosità definita (diametro 1-20 µm) e ripetibilità procedurale. Gli studi di caratterizzazione microstrutturale delle matrici (analisi SEM) hanno suggerito che la tecnica di **inversione di fase** associata all'impiego di saccarosio come porogeno consente di ottenere matrici riproducibili e con porosità ideale (Matrice PCL 4). La tecnica di **casting solvent** ha prodotto matrici altamente porose, friabili, di spessore inferiore a 3 mm (Matrice PCL C5) mentre la procedura di **Fili per estrusione**, sperimentata utilizzando PLA, è risultata riproducibile, di facile realizzazione e ha consentito l'ottenimento di una elevata resa. La matrice PCL 4, considerata ideale in ragione delle similitudini alla struttura dell'osso spugnoso, è stata testata per la capacità di sostenere l'adesione, la proliferazione e la colonizzazione cellulare. Sul supporto, che mediante analisi SEM è risultato caratterizzato da pori comunicanti, di diametro di circa 20-40 µm, sono state seminate popolazioni cellulari umane (CCU) isolate da sangue cordonale e a potenzialità osteodifferenziativa.

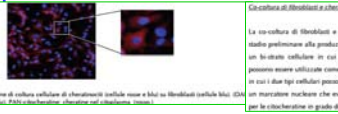
**Preadipociti**  
Dopo 24h dall'incapsulazione in *Puramatrix Peptide Hydrogel* le subcolture di preadipociti si presentano all'analisi di microscopia ottica, di forma allungata. Lo studio di vitalità cellulare mediante saggio MTT ha evidenziato un effetto citotossico del gel nelle prime 24 h dall'incapsulazione; mentre in tempi successivi, è stata osservata proliferazione e colonizzazione cellulare della matrice. Dopo stimolazione per 12 giorni con terreno differenziativo preparato con fattori stimolanti sono stati osservati, rispetto al controllo indifferenziato, evidenti cambiamenti morfologici e formazione di elementi cellulari maturi di forma globosa, univacuolari, attivi nella sintesi dell'ormone *leptina* (tipico della fase differenziativa adipogena tardiva), espressione sul plasmalemma del trasportatore del glucosio GLUT4 e di proteine di matrice extracellulare quali collagene di tipo IV e laminina in modo più precoce rispetto al controllo di differenziamento in modello 2D.



**Cheratinociti**  
Popolazioni di cultura primaria sono state seminate sulla superficie del gel peptidico. Sebbene dai risultati ottenuti con il saggio MTT si sia evidenziata una progressiva proliferazione cellulare nel tempo, i cheratinociti non hanno mostrato la tendenza a formare monostrati bensì si sono organizzati, **stratificandosi**, all'interno di cluster di dimensioni diverse. Inoltre, non si è osservato alcun cambiamento nella reattività agli anticorpi anti-AE1 e-AE3.

**Fibroblasti**  
Subcolture di I e II generazione sono state coltivate per 2, 3, 4 e 7 giorni in *Puramatrix Peptide Hydrogel*. Dall'analisi statistica effettuata sui dati ottenuti mediante saggio MTT, è risultato un aumento massivo della vitalità cellulare al 3° giorno di cultura. In tempi successivi, i fibroblasti hanno mostrato una attiva sintesi e secrezione di collagene di tipo I e di tipo III.

**Conclusioni**  
I risultati ottenuti permettono di concludere che lo scaffold preparato con il polimero ottenuto mediante inversione di fase e con porosità definita attraverso la partecipazione del saccarosio in varie percentuali rappresenta un interessante strategia per la preparazione di sostituti tissutali ossei a porosità desiderata e quindi adeguate alle diverse tipologie di protesi da realizzare.



**Conclusioni**  
Alla luce dei risultati ottenuti, è possibile concludere che la matrice sintetica *Puramatrix Peptide Hydrogel* garantisce, rispetto al sistema di cultura classico 2D, un maggior grado proliferativo di popolazioni di preadipociti, fibroblasti e cellule endoteliali consentendone, inoltre, un adeguato livello di organizzazione tridimensionale e differenziamento specifico. Queste metodologie permettono quindi di realizzare in vitro modelli tridimensionali validi e versatili della cute umana per lo studio in vitro dei meccanismi cellulari di riparazione delle ferite e degli effetti di sostanze cosmetiche e farmacologiche evitando l'uso della sperimentazione animale, secondo la direttiva CEE che tra breve entrerà in vigore.