

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE BIOMEDICHE

Biotechnologie Mediche

Ciclo XXIII

MED/33 – Malattie dell'apparato locomotore

**SUPERFICI BIOMIMETICHE PER IMPIANTI OSSEI: ADESIONE
CELLULARE E ATTIVAZIONE DEL DIFFERENZIAMENTO
OSTEOGENICO**

Presentata da: Dott.ssa Caterina Fotia

Coordinatore Dottorato

Chiar.ma Prof.ssa Marialuisa Zerbini

Relatore

Chiar.mo Prof. Nicola Baldini

Esame finale anno 2011

Sommario

<i>Introduzione</i>	4
Il processo di guarigione ossea	4
Cellule staminali	7
Eventi molecolari nella riparazione ossea	10
Ingegneria tissutale in ortopedia	16
Biomateriali e scaffolds	18
Biomimetica del tessuto osseo	21
Integrazione osso-impianto	24
<i>Risposta cellulare a un nuovo cemento osseo poroso, iniettabile e bioattivo a base di soia e gelatina</i>	26
Obiettivo dello studio	26
<i>Materiali e Metodo</i>	28
Colture cellulari di linee cellulari simil-osteoblastiche	28
Colture cellulari di cellule endoteliali umane dalla vena ombelicale	29
Adesione cellulare	30
Vitalità cellulare	30
Preparazione cementi porosi a base di calcio fosfato	31
Studi in vitro	32
<i>Risultati</i>	34
Caratterizzazione dei compositi porosi	34
Tossicità indiretta dei compositi	38
Interazione cellule/compositi	39
<i>Discussione e Conclusioni</i>	45
<i>Caratterizzazione dell'adesione cellulare su substrati carichi</i>	48
Obiettivo dello studio	48

<i>Materiale e Metodo</i>	49
Preparazione dei substrati	49
Preparazione dei polielettroliti	49
Colture cellulari	50
Particle exclusion assay	51
Microscopia time-lapse	51
Trasfezione cellulare	51
Marcatura della matrice pericellulare	52
Immunofluorescenza per le molecole di adesione	52
Trattamento con ialuronidasi	53
<i>Risultati</i>	54
Caratterizzazione dei polielettroliti	54
Determinazione indiretta della matrice pericellulare	56
Valutazione dell'adesione cellulare sui vari substrati	57
<i>Discussione e Conclusioni</i>	81
<i>Bibliografia</i>	87

Introduzione

Il processo di guarigione ossea

L'osso è un tessuto vascolarizzato altamente dinamico, costantemente soggetto a rimodellamento durante tutto il corso della vita. Il costante rimodellamento garantisce potenzialità di guarigione mediante rigenerazione del tessuto danneggiato senza che si formi tessuto cicatriziale. Tale processo si attua non solo in seguito ad un insulto traumatico, quale una frattura, ma anche quando si rende necessario l'innesto di un impianto artificiale endosseo o la resezione di un segmento osseo.

Nel processo di guarigione ossea, istologicamente si distinguono tre fasi: 1) fase infiammatoria precoce (formazione dell'ematoma, infiammazione, angiogenesi) con formazione del tessuto di granulazione, 2) fase riparativa, caratterizzata dalla formazione del callo cartilagineo e osseo immaturo e, successivamente, dalla sostituzione del callo con osso lamellare, 3) fase di rimodellamento tardiva che consente, nel tempo, di ripristinare la forma originale dell'osso (figura 1).

Infiammazione. (figura 1A) In caso di frattura, il trauma comporta, oltre alla perdita dell'integrità scheletrica, la distruzione della struttura vascolare che compromette l'apporto di nutrienti al sito della lesione. Ciò determina una ridotta tensione di ossigeno e la distruzione dell'architettura del midollo. L'ematoma che si genera rappresenta una fonte di molecole segnale (fattori di crescita e citochine) per i precursori monocito-macrofagici e osteo-condroblastici.¹ Durante la fase precoce, i precursori mesenchimali proliferano e si differenziano in senso osteogenico e condrogenico²; si assiste inoltre alla formazione di nuovi vasi sanguigni per gemmazione dalle strutture vascolari preesistenti attraverso una complessa catena di eventi: degradazione enzimatica della membrana basale, migrazione delle cellule endoteliali in direzione dello stimolo angiogenico,

proliferazione, maturazione e organizzazione delle cellule endoteliali in tubi capillari.

Riparazione. (figura 1B,C) L'ossificazione intramembranosa ha inizio pochi giorni dopo il danno tissutale, mentre l'ossificazione encondrale, che coinvolge i tessuti adiacenti al sito della frattura, si sviluppa nell'arco di un mese circa. L'area subperiostale e i tessuti molli immediatamente circostanti il sito della frattura formano il cosiddetto 'callo duro' e creano direttamente nuovo tessuto osseo. In tale processo, i precursori mesenchimali reclutati nel sito della lesione si differenziano in senso osteoblastico e producono sia osso compatto che osso trabecolare, senza indurre la formazione di cartilagine.

L'ossificazione encondrale procede attraverso il reclutamento e la proliferazione dei progenitori multipotenti ed il loro differenziamento in cartilagine. La proliferazione delle cellule staminali mesenchimali (MSC) è già evidente tre giorni dopo la frattura e rimane elevata per alcuni giorni.³

La condrogenesi determina la formazione di un callo cartilagineo che riempie e stabilizza il sito della frattura. Dopo due settimane tali cellule vanno incontro a ipertrofia e producono collagene di tipo X. In seguito, la membrana parzialmente mineralizzata viene riassorbita e sostituita con una matrice formata principalmente da collagene di tipo I.

I condrociti rilasciano fosfatasi e proteasi che consentono la mineralizzazione della matrice⁴. Dopo 4-5 settimane si attivano i condroclasti, cellule multinucleate responsabili della degradazione della cartilagine calcificata. Durante il riassorbimento della matrice cartilaginea, i condroclasti inviano dei segnali che inducono i vasi sanguigni a penetrare nel tessuto, portando con sé cellule mesenchimali staminali perivascolari che si differenzieranno in cellule osteoprogenitrici. Le cellule endoteliali, assieme ad altri tipi cellulari che esprimono metalloproteasi, facilitano l'invasione vascolare e la rimozione dei setti e delle strutture cartilaginee residue.⁵

I tessuti derivanti dall'ossificazione intramembranosa ed encondrale crescono fino a congiungersi, e dopo 6-7 settimane si osserva una combinazione di cartilagine calcificata e nuovo osso trabecolare. La transizione da cartilagine a

osso avviene attraverso una serie di eventi sequenziali di rimozione cellulare e modificazione della matrice, durante la quale i condrociti vanno incontro ad apoptosi.⁶

Rimodellamento. (figura 1D) La completa guarigione della frattura si ottiene con la fase di rimodellamento, in cui osteoblasti ed osteoclasti cooperano al fine di convertire il callo di frattura in una struttura ossea capace di sostenere i carichi meccanici fisiologici.

A differenza di quanto accade nel corso dello sviluppo delle ossa lunghe, in cui la crescita apposizionale periostale è bilanciata dal riassorbimento della superficie endostale, nel rimodellamento del callo della frattura si assiste ad una rimozione esterna di osso e ad una apposizione sulle superfici interne. La distruzione enzimatica della matrice ossea da parte degli osteoclasti porta a rilascio di varie proteine, tra cui i fattori di crescita immagazzinati precedentemente durante la formazione di osso. Essi, assieme alle citochine prodotte dagli osteoclasti e da altre cellule, reclutano nel sito di lesione gli osteoprogenitori che si differenziano in osteoblasti. Gli osteoblasti penetrano nelle cavità di riassorbimento, producono nuova matrice ossea di tipo intrecciato o lamellare e, rimanendovi intrappolati, si differenziano in osteociti.⁷ Infine alcuni osteoblasti assumono una morfologia piatta e si dispongono sulle superfici quiescenti dell'osso (c.d. 'bone lining cells').

L'angiogenesi ha un ruolo di fondamentale importanza nella regolazione del rimodellamento osseo e della riparazione delle fratture. Fattori angiogenici quali il *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) e l'endotelina sono regolatori dell'osteoclasto e dell'osteoblasto, ed inoltre la formazione di vasi sanguigni è funzionale al trasporto di precursori osteoclastici ed osteoblastici circolanti nel sito di rimodellamento attivo. Il rimodellamento osseo è associato ad un flusso sanguigno più intenso attraverso i microvasi che si adattano alla superficie dell'osso spugnoso.⁸

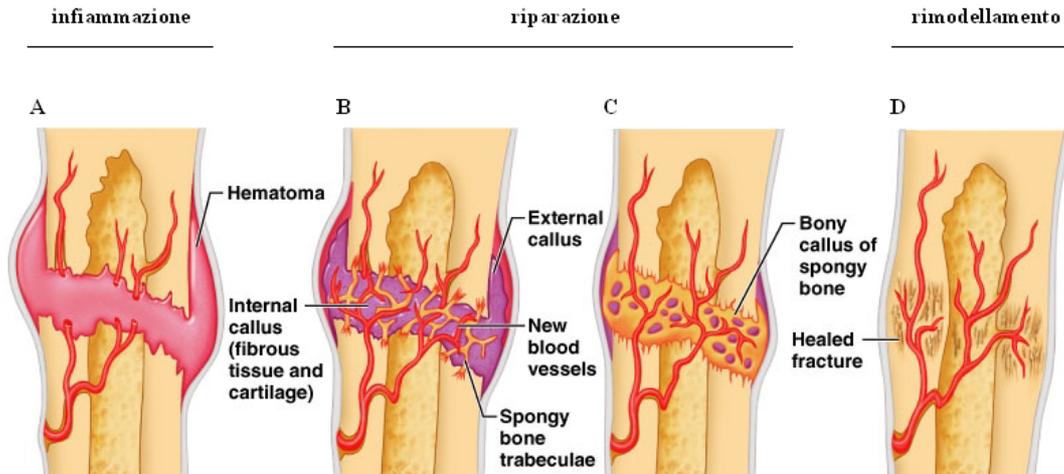


Figura 1: processo di guarigione ossea in seguito a frattura

1. *Infiammazione*: A) fase caratterizzata dalla formazione dell'ematoma, migrazione e proliferazione dei precursori mesenchimali e formazione di nuovi vasi sanguigni che invadono l'ematoma. 2. *Riparazione*: B) si formano centri di formazione del callo cartilagineo; C) il callo cartilagineo viene invaso da nuovi vasi sanguigni e da precursori osteogenici. Gli osteoclasti degradano la cartilagine, gli osteoblasti invadono il callo e sostituiscono il tessuto con nuova matrice ossea, formando il "callo duro". 3. *Rimodellamento*: il callo duro è una massa di osso compatto; gli osteoclasti e gli osteoblasti iniziano il rimodellamento per ricreare la forma dell'osso originale.

Cellule staminali

Il termine 'staminale' identifica una cellula capace di proliferare, autorigenerarsi (*self-renewal*), differenziarsi e rigenerare tessuti in vivo. Esistono due tipi di cellule staminali: embrionali e staminali adulte. Le cellule staminali embrionali (ESC) derivano dalle cellule interne della blastocisti, pochi giorni dopo la fecondazione dell'uovo, e possono convertirsi in cellule di qualunque linea differenziativa. Le cellule staminali adulte possono essere isolate da midollo osseo, periostio, tessuto adiposo, tessuto muscolare, sinovia, polpa dentale, fluido amniotico e tessuti fetali; la loro importanza e attività e i loro siti di deposito *in vivo* sono ancora solo parzialmente conosciuti. Le cellule staminali del midollo osseo adulto sono state studiate ampiamente per il trattamento di disordini

ematologici. Sebbene la staminalità di tali cellule non sia stata dimostrata, l'acronimo hMSC indica 'human multipotent mesenchymal stromal cell' e definisce cellule non emopoietiche (CD34-) derivate dallo stroma, aderenti alla plastica e capaci di differenziare in osteoblasti, adipociti o condroblasti *in vitro*.^{9,10}

Per quanto riguarda le applicazioni cliniche, per ragioni etiche non è consentito l'uso delle ESC indotte al completo differenziamento prima del trapianto, dal momento che si renderebbe necessaria la distruzione dell'embrione di origine. Le hMSC autologhe sono invece usate in protocolli clinici per il trattamento della cardiopatia ischemica, di malattie vascolari, di lesioni del midollo spinale, di mancata consolidazione di fratture, dell'osteogenesi imperfetta, di malattie neurologiche e del diabete di tipo I.¹¹

Sfortunatamente a tutt'oggi non esiste un antigene di superficie unicamente espresso dalle hMSC, e ciò ne impedisce la selezione a partire da una popolazione eterogenea, quale è il midollo osseo.

Le hMSC esprimono antigeni quali CD105, CD90, CD73, LNGFR, D7-Fib e CD44, ma durante l'espansione *in vitro* si assiste alla perdita di alcuni di essi,¹² pertanto tali cellule vengono identificate tramite una combinazione di saggi biochimici, morfologici e funzionali.

Il midollo osseo è costituito da cellule stromali ed ematopoietiche; le prime comprendono cellule commissionate, come adipociti ed osteoblasti, e precursori multipotenti. La percentuale di hMSC nel midollo osseo è molto bassa (0,001-0,01%). Il tessuto adiposo contiene cellule staminali multipotenti molto simili alle hMSC del midollo osseo e che possono essere isolate in elevata quantità mediante liposuzione cosmetica. La proporzione di precursori clonogenici multipotenti (*colony forming unit*/CFU), che rappresentano la reale componente di precursori nella popolazione totale di hMSC *in vitro*, è di 1:100 nel tessuto adiposo, ossia circa 500 volte più alta che nel midollo osseo.¹³

La plasticità delle hMSC è un ulteriore oggetto di discussione, dal momento che i diversi protocolli sperimentali determinano la selezione di popolazioni diverse di hMSC. Le hMSC possono riparare un tessuto danneggiato differenziandosi nel

fenotipo opportuno, rilasciando citochine e fattori di crescita ed andando incontro a fusione cellulare. Le principali prove della loro plasticità *in vitro* sono la capacità di ‘de-differenziarsi’ a partire da un fenotipo condrocitico o adipocitico precedentemente acquisito, per poi progredire verso la linea differenziativa osteoblastica, e la capacità di ‘trans-differenziarsi’, ossia di andare incontro al processo noto come ‘transizione epitelio-mesenchimale’ (EMT). Tuttavia, alcuni autori ritengono che ad essere responsabile del cambiamento fenotipico delle hMSC sia la fusione cellulare piuttosto che i due meccanismi sopra descritti, pertanto la plasticità osservata sarebbe semplicemente correlata all’eterogeneità della popolazione.¹⁴

Anche la consistenza della matrice cellulare potrebbe guidare inizialmente il commissionamento delle hMSC, sebbene non sia sufficiente per il completamento del differenziamento.¹⁵ Su substrati semi-solidi (0,1-1 kPa), che simulano la consistenza del tessuto cerebrale, le hMSC mostrano un fenotipo simil-neuronale; su substrati di rigidità intermedia (8-17 kPa) esse si differenziano in mioblasti, e su substrati rigidi (25-40 kPa), come l’osso, le hMSC assumono il fenotipo osteoblastico. Se lo stimolo committente è prolungato per qualche settimana, il differenziamento non è reversibile tramite l’aggiunta di fattori solubili specifici per un’altra linea differenziativa. Tale osservazione, oltre ad essere consistente con la perdita di elasticità delle cellule differenziate, mette in evidenza il ruolo del microambiente (in particolare dei fattori meccanici) nel determinare il destino delle cellule indifferenziate e suggerisce un ulteriore meccanismo tramite il quale potrebbe essere definito l’*homing* delle cellule. (Figura 3)

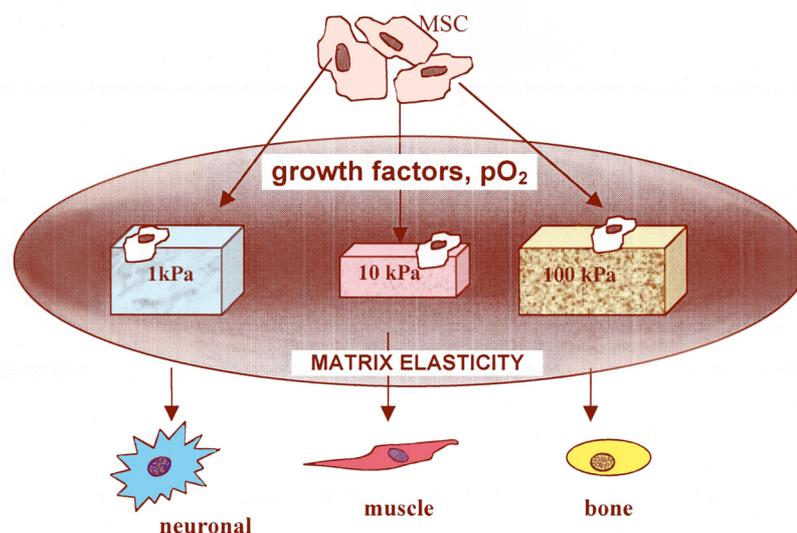


Figura 2. Il differenziamento delle hMSC è influenzato dalla consistenza della matrice extracellulare circostante, che fornisce alle cellule un segnale meccanico. Come descritto da Engler et al.,¹⁵ un substrato semi-solido (1kPa) può indurre l'acquisizione di un fenotipo simil-neuronale; un substrato di rigidità intermedia (10kPa) determina l'acquisizione di un fenotipo mioblastico, ed un substrato rigido (100kPa) induce il differenziamento delle hMSC in osteoblasti.

Le hMSC riscuotono grande interesse nel campo dell'ingegneria tissutale in quanto possono facilmente essere isolate dal midollo osseo attraverso disaggregazione meccanica, sono in grado di eludere il riconoscimento da parte del sistema immunitario dell'ospite, possiedono proprietà immunosoppressive, e in condizioni ottimali mostrano una buona capacità di autoreplicazione, essendo in grado di andare incontro a 25-40 passaggi cellulari *in vitro*.

Eventi molecolari nella riparazione ossea

Nelle varie fasi della guarigione ossea le attività cellulari vengono regolate da programmi trascrizionali che coinvolgono centinaia di geni. La tecnologia dei *microarray* ha permesso di eseguire l'analisi su larga scala del trascrittoma nelle diverse fasi del processo di guarigione della frattura.¹⁶ I geni implicati in attività

metaboliche o con funzione di trasporto e legame risultano sovraespressi a 24 ore dalla frattura, momento in cui si osserva un aumento della divisione cellulare. L'analisi proteomica funzionale ha dimostrato che la fase di preparazione alla guarigione della frattura coinvolge la regolazione del ciclo cellulare e la segnalazione cellula-cellula, confermando il ruolo essenziale della comunicazione cellulare nella riparazione tissutale.¹⁷

Quattro giorni dopo la frattura, l'ematoma è invaso da cellule indifferenziate e tessuto connettivo vascolarizzato, mentre i macrofagi rimuovono i detriti ed il numero di neutrofili diminuisce. In questa fase, il pattern di espressione genica è caratterizzato da 2 gruppi di geni. Ad un gruppo appartengono geni la cui espressione aumenta progressivamente dal primo al quarto giorno. Questi sono geni funzionalmente associati al processo riparativo, come *insulin-like growth factor* (IGF-I), *platelet-derived growth factor* (PDGF), *fibroblast-growth factor receptor* (FGFR), collagene cartilagineo (tipo VI e XI) e collagene osseo (tipo I, V, VI e XII), fibronectina, metalloproteasi di matrice, glicani, osteonectina e tenascina C. Al secondo gruppo appartengono geni che controllano la crescita e la sopravvivenza cellulare, e svolgono funzioni di legame, trasporto ed attività catalitica che vengono invece costantemente sovraespressi. Durante la fase di ossificazione diretta, che ha inizio il quarto giorno, le proteine differenzialmente espresse sono associate alla regolazione della morte cellulare, alla risposta immunitaria ed al *signaling* cellulare. Inoltre l'interleuchina 6 (IL-6) risulta fortemente espressa e svolge un ruolo chiave nel coordinare i tre gruppi funzionali.

Il settimo giorno le *pathways* di PDGF, VEGF, *peroxisome proliferator-activated receptor alpha* (PPAR) e, a valle, *phosphoinositide 3-kinases/protein kinase B* (PI3K/AKT) (coinvolto nella sopravvivenza cellulare) sono i più attivi, e si ha l'inizio dell'ossificazione encondrale, fase caratterizzata da condrociti ipertrofici e cellule a morfologia osteoclastica che rimuovono la cartilagine.

Al termine dell'ossificazione encondrale, intorno al 28° giorno, incomincia la fase del rimodellamento, che vede coinvolte le *pathways* di PI3K/AKT, IGF-I, MAPK/ERK e delle integrine.

I fattori di crescita (GF) più rilevanti nella biologia del tessuto osseo sono: *bone morphogenetic proteins* (BMP), *transforming growth factor β* (TGF β), FGF, PDGF, VEGF e IGF (tabella 1). Essi vengono prodotti e secreti dalle cellule del microambiente osseo, come fibroblasti, cellule endoteliali, hMSC ed osteoblasti, e attivano delle cascate di trasduzione del segnale responsabili della regolazione delle diverse funzioni cellulari. BMP, PDGF, FGF e VEGF stimolano la migrazione degli osteoprogenitori, TGF β , IGF, BMP6, BMP2 e BMP7 ne modulano la proliferazione ed il differenziamento, mentre VEGF e FGF2 regolano la crescita vascolare. La forte correlazione esistente tra VEGF, TGF β e IGF-I suggerisce che essi agiscano in maniera coordinata nella crescita degli osteoprogenitori.¹⁸

Tabella 1. Fattori di crescita e ruolo nella riparazione ossea

<i>Fattore di crescita</i>	<i>Sorgente fisiologica</i>	<i>Recettore</i>	<i>Funzione</i>	<i>Azione sul tessuto osseo</i>
Bone morphogenetic proteins (BMP)	Cellula osteoprogenitrice, osteoblasto, condrocita, cellula endoteliale (BMP2)	Serina treonina solfato	Osteocondrogenesi. BMP2-7 e BMP9 sono osteoinduttive	Induzione di chemiotassi, proliferazione, differenziamento e sintesi della ECM; contributo all'angiogenesi
Transforming growth factor β (TGF β)	Piastrine, cellula stromale midollare, condrocita, cellula endoteliale, fibroblasto, macrofago	Serina treonina solfato	Immunosoppressore proangiogenetico; induttore della crescita cellulare, del differenziamento e della sintesi della matrice	Induzione della proliferazione di cellule mesenchimali; reclutamento dei precursori osteoblastici; induzione del differenziamento osteoblastico e condroblastico precoce (ma inibizione del differenziamento terminale); produzione della ECM; reclutamento dei precursori osteoclastici
Fibroblast growth factor (FGF)	Macrofago, monocita, cellula stromale midollare, condrocita, osteoblasto, cellula endoteliale	Tirosin chinasi	Proangiogenetico; mitogeno per fibroblasti e cellule muscolari lisce della parete vascolare	FGF1 induce la maturazione dei condrociti; FGF2 induce proliferazione e differenziamento osteoblastico, inibisce l'apoptosi degli osteoblasti immaturi, mentre stimola l'apoptosi degli osteociti ed il riassorbimento osseo
Platelet-derived growth factor (PDGF)	Piastrine, osteoblasto, cellula endoteliale, monocita, macrofago	Tirosin chinasi	Mitogeno per le cellule del tessuto connettivo, chemiotattico per monociti, macrofagi e cellule muscolari lisce; proangiogenetico	Stimola proliferazione e differenziamento degli osteoprogenitori
Vascular endothelial	Cellula endoteliale,	Tirosin chinasi	Proangiogenetico;	Conversione della

growth factor (VEGF)	osteoblasto, piastrine		chemiotattico per le cellule endoteliali	cartilagine in osso; proliferazione e differenziamento osteoblastico; induzione dell'espressione di RANK nei precursori osteoclastici
Insulin-like growth factor (IGF)	Osteoblasto, condrocita, epatocita, cellula endoteliale	Tirosin chinasi	Regolazione dell'attività biologica dell'ormone crescita	Stimola la proliferazione degli osteoblasti e la sintesi della ECM; riassorbimento della osseo

Diverse vie di trasduzione del segnale sono implicate nel differenziamento delle hMSC in senso osteogenetico.

Wnt signaling pathway. Le proteine Wnt regolano crescita, differenziamento, funzione e morte cellulare, ed hanno un ruolo fondamentale nella biologia del tessuto osseo. Appartengono ad una famiglia di glicoproteine secrete, che legano i recettori transmembrana *frizzled* (FZD) attivando due distinte vie di trasduzione del segnale: la pathway canonica ed quella non canonica di Wnt. La prima coinvolge la formazione di un complesso tra le proteine Wnt, FZD, ed il corecettore *low-density lipoprotein receptor related protein* (LRP) 5 o 6.

Evidenze sperimentali affermano il ruolo importante della pathway canonica di Wnt nella formazione del tessuto osseo e nell'espressione di marcatori specifici degli osteoblasti in vitro. È probabile che l'attività della β -catenina sia necessaria per l'attivazione di fattori di trascrizione specifici, come Runx2, la cui assenza nell'osteochondroprogenitore, ossia il precursore bipotenziale della linea osteoblastica, determina inevitabilmente il differenziamento in senso condrogenico.¹⁹ E' stato dimostrato, inoltre, come la β -catenina agisca in sinergia con la BMP-2, stimolando l'attività dell'ALP e l'espressione degli altri marcatori osteoblastici.²⁰

TGF β signaling. Diversi membri della superfamiglia del TGF β , come le BMP, hanno potenti effetti osteogenetici.

Le BMP sono immagazzinate nella matrice extracellulare e vengono sintetizzate principalmente da cellule osteoprogenitrici, osteoblasti e condrociti.²¹ Esse inducono la cascata di eventi che determina l'osteochondrogenesi, come chemiotassi, proliferazione, differenziamento, sintesi della matrice extracellulare ed angiogenesi. Le proteine Smad sono regolatori critici nel TGF β signaling

pathway, anche se la BMP2 può attivare risposte Smad-indipendenti, che coinvolgono la via delle MAP chinasi (ERK, JNK e p38) e determinano la regolazione dell'espressione della fosfatasi alcalina e dell'osteocalcina nelle cellule osteoblastiche. Inoltre le BMP sono in grado di stimolare la sintesi di altri fattori di crescita, quali IGF e VEGF,²² e d'indurre il rilascio di fattori che promuovono l'osteoclastogenesi.²³

TGF β 1 e TGF β 2 vengono immagazzinati nella ECM e nel sangue in una forma inattiva. Durante il processo di guarigione ossea TGF β ha un ruolo rilevante nella condrogenesi e nell'ossificazione encondrale.²⁴ TGF β 1 induce la sintesi di BMP nelle cellule osteoprogenitrici, recluta i precursori osteoblastici, stimola il differenziamento ed induce la produzione di osteoide e proteine extracellulari quali collagene, proteoglicani, osteopontina, osteonectina e ALP.²⁵ TGF β 1 è un importante fattore di coupling tra osteoblasti ed osteoclasti:²⁶ da un lato favorisce il reclutamento dei precursori ematopoietici degli osteoclasti,²⁷ dall'altro ha un effetto inibitorio sul riassorbimento osseo e stimola la produzione di osteoprotegerina.²⁸

FGF signaling. I polipeptidi della famiglia FGF regolano l'ossificazione encondrale e membranosa attraverso quattro recettori tirosin-chinasici correlati (Fgfr1-Fgfr4). Fgfr1 è espresso nei condrociti ipertrofici ed ha effetti stadio-specifici sulla maturazione degli osteoblasti: stimola il differenziamento dei precursori, ma arresta la maturazione degli osteoblasti differenziati.²⁹

FGF 2, 9 e 18 interagiscono probabilmente con Fgfr1 espresso dagli osteoblasti. FGF2 sembra essere il mediatore più rilevante nel periodo postnatale, negli osteoblasti differenziati attiva Runx2 attraverso il *mitogen activated phosphokinase* (MAPK) pathway e ha un ruolo importante nella regolazione della mineralizzazione e della formazione dell'osso. Esso regola l'osteoclastogenesi in maniera indiretta, tramite meccanismi mediati dagli osteoblasti, ed in maniera diretta, agendo sulle pathway di segnalazione di RANKL. FGF18 è il ligando fisiologico di Fgfr3, che regola la crescita ed il differenziamento dei condrociti proliferanti e la densità e lo spessore corticale dell'osso.³⁰

Notch signaling. Notch 1 e Notch 2 sono espressi dagli osteoblasti, mentre Notch 3 e Notch 4 sono stati identificati in sottogruppi della linea osteogenica. Dati sperimentali sostengono la funzione dimorfica del Notch signaling, che sembra essere in grado di regolare positivamente l'espressione dei geni del differenziamento osteoblastico ed indurre osteosclerosi, ma anche di reprimere la maturazione degli osteoblasti indotta dalla BMP, inibendo l'azione transattivatrice di Runx2.³¹

Fattori di trascrizione (TF). I TF guidano il commissionamento tessuto-specifico delle hMSC. Il commissionamento iniziale che induce le hMSC ad assumere il fenotipo osteocondroblastico è mediato principalmente dal TF Runx2, mentre il destino dell'osteocondroprogenitore è determinato dall'attività di Osterix e Sox9, implicati rispettivamente nel differenziamento osteogenico e condrogenico.³²

Runx2, membro della famiglia dei fattori *Runt-related*, è considerato l'interruttore molecolare chiave del differenziamento osteoblastico, in quanto media l'attivazione temporale e/o la repressione di geni essenziali nel processo.³³ Runx2 è abbondantemente espresso nella cartilagine calcificata e nell'osso. Possiede un dominio di transattivazione che attiva i promotori di osteocalcina e collagene di Tipo 1 (COL1A1); la sua inattivazione determina l'inibizione della formazione di osso, rivelando il ruolo essenziale del TF nell'ossificazione endondrale e diretta. Oltre ad essere espresso negli osteoprogenitori ad uno stadio precoce del differenziamento, Runx2 è essenziale per la funzionalità degli osteoblasti. Molti TF coinvolti nella regolazione del differenziamento osteoblastico esercitano la loro funzione interagendo con Runx2, alcuni fornendo segnali co-stimolatori, altri reprimendolo direttamente.

A valle di Runx2 si trova Osterix (Osx), un altro importante fattore trascrizionale necessario per il differenziamento del preosteoblasto in osteoblasto funzionale, il quale esprimerà alti livelli di ALP, collagene di Tipo I, sialoproteine ossee e osteocalcina.³⁴

Ingegneria tissutale in ortopedia

L'ingegneria tissutale è un campo interdisciplinare in cui si uniscono conoscenze di ingegneria a quelle delle scienze della vita per creare sostituti biologici che consentono di migliorare, riparare o curare i tessuti biologici. Negli ultimi vent'anni gli studi sono stati incentrati sulla complessità dei tessuti biologici, in termini di complessità macromolecolare e organizzazione ultrastrutturale, e sulla potenzialità di utilizzare cellule, fattori e costrutti per la ricostruzione tissutale. I notevoli progressi scientifici ottenuti nei diversi campi (biomateriali, cellule staminali, fattori di crescita e del differenziamento) hanno permesso di generare dei veri e propri tessuti in laboratorio mediante la combinazione di matrici extracellulari ingegnerizzate (scaffolds), cellule e molecole biologicamente attive. Attualmente, tra le maggiori sfide dell'ingegneria tissutale vi è la necessità di migliorare le funzionalità complesse, come la stabilità meccanica e funzionale, dei costrutti ingegnerizzati destinati all'impianto per consentire il superamento dei limiti dei trattamenti convenzionali.

In campo ortopedico gli eventi traumatici, l'osteoporosi, le neoplasie, le malformazioni congenite, sono tutti eventi che possono portare a grandi perdite di sostanza. Il trattamento chirurgico prevede due possibilità, l'innesto di osso, autologo o allogenico, o l'impiego di costrutti ingegnerizzati. L'osso autologo rappresenta una soluzione sicura per la compatibilità e l'assenza di risposta immunitaria, ma anche disagiata poiché è richiesto un secondo intervento e presenta un rischio di morbidità associato al prelievo. Inoltre è spesso difficile sopperire alla quantità di tessuto necessaria alla sostituzione della porzione mancante, e la qualità dell'osso recuperato non consente buoni risultati al reimpianto.

Per quanto riguarda l'osso allogenico, la crescente diffusione di banche dell'osso consentono un maggiore utilizzo di innesti di tale tipo, che però molto spesso sono soggetti a scarso rimodellamento e insufficiente rivascolarizzazione, funzionando quindi da mero supporto. Inoltre, non sono da sottovalutare anche

problematiche quali il rigetto e il rischio di infezioni legato all'impianto di tessuti di origine omologa.

L'ingegneria tissutale rappresenta l'alternativa ai metodi tradizionali, e, due diverse strategie sono emerse come approcci promettenti: la *tissue engineering* e la *in situ tissue regeneration*. Il primo prevede la semina e il differenziamento di hMSC autologhe su *scaffold* e l'impianto del sistema cellule-*scaffold* dopo un breve periodo di incubazione *ex vivo*; i costrutti ingegnerizzati, una volta reimpiantati nel paziente, dovrebbero essere gradualmente riassorbiti e sostituiti da tessuti vitali grazie all'apporto vascolare e nervoso. Le applicazioni cliniche già in uso comprendono cartilagine, cute e sistema vascolare. La *in situ tissue regeneration* prevede la funzionalizzazione degli *scaffolds* con siti specifici per l'ancoraggio cellulare o con fattori che facilitino il reclutamento cellulare (chemiotassi) promuovendo la riparazione locale. Molecole o fattori che attivano la proliferazione cellulare, come le BMPs, possono essere coniugate chimicamente al materiale e rilasciate nei tessuti a velocità controllata, per diffusione o frammentazione del supporto.

A seconda della tecnica di ingegneria tissutale applicata si distinguono: sistemi acellulari, sistemi cellulari e terapie con fattori e geni. Nei primi (*matrix-based approaches*), le componenti chimiche e strutturali dello *scaffold* giocano un ruolo predominante per la corretta riparazione. Relativamente al tessuto scheletrico, pori e interconnessioni devono necessariamente essere di dimensioni tali da consentire vitalità e funzioni di cellule ossee, cellule vascolari e tessuto osteoide. I supporti devono essere inoltre biodegradabili nei tempi appropriati, parallelamente alla rigenerazione ossea *in situ*, senza generare prodotti tossici. La creazione di sistemi cellulari (*cell-based therapies*) prevede la raccolta di cellule dal sito donatore, la semina sul supporto, l'induzione della proliferazione e del differenziamento cellulare e infine il trapianto del costrutto così ingegnerizzato. Al fine di ottenere un'efficace e stabile riparazione occorre ottenere un numero adeguato di cellule o tessuto per riempire il difetto, nonché mantenere il corretto fenotipo cellulare. Le cellule, quindi, dovrebbero organizzarsi in strutture tridimensionali e produrre matrice extracellulare, in modo da ottenere in tempi

adeguati una piena integrazione locale con il tessuto ospite e la vascolarizzazione del tessuto neoformato.

Infine, le *factor-based therapies* consistono nell'associare al sistema *scaffold*/cellule uno stimolo osteoinduttivo. Il primo esempio è stato l'uso della *demineralized bone matrix* (DBM) e successivamente delle BMPs purificate. Gli aspetti complessi di questa tecnica comprendono la difficoltà di legare in modo funzionale i fattori a molecole di trasporto o ai supporti, ma anche quella di modularne in maniera efficace l'emivita e il rilascio graduale.

Altro approccio è rappresentato dalle *gene o cell therapies* che si basano sull'impiego di vettori (virali e non), per il trasferimento di materiale genetico a cellule che verranno poi impiantate. Studi preclinici hanno dimostrato la maggiore efficacia delle BMPs mediante questo tipo di approccio, poiché è possibile mantenere la loro espressione a livelli idonei per un periodo di tempo più lungo rispetto al rilascio diretto della proteina.^{35,36} Le cellule ingegnerizzate diventano quindi semplici *carrier* dei geni appropriati e producono il fattore osteoinduttivo. Questo approccio comporta inevitabilmente un alto rischio di trasmissione di vettori patogeni.

L'ingegneria tissutale si propone di utilizzare biomateriali con sempre più elevata capacità di integrazione, con proprietà meccaniche molto simili all'osso nativo e con cinetiche di riassorbimento controllate. Tali biomateriali devono inoltre presentare una serie di proprietà atte ad indurre nella cellula una specifica risposta che stimoli l'osteogenesi e l'angiogenesi. Per l'impiego in clinica è inoltre auspicabile la disponibilità di materiali modellabili in fase pre-operatoria o durante la seduta operatoria, secondo le necessità anatomiche dell'intervento.

Biomateriali e scaffolds

Nell'ambito della rigenerazione ossea, lo scopo degli *scaffold* è quello di fornire un analogo della matrice extracellulare (ECM) osteoconduttiva per sostenere l'adesione cellulare iniziale, la proliferazione e lo sviluppo di nuovo osso. La

natura chimica, l'architettura, la porosità e la velocità di degradazione dello scaffold devono associarsi alle seguenti caratteristiche: facilità di impianto, rigidità meccanica simile all'osso, promozione dell'adesione, proliferazione e migrazione cellulare, facilità di scambi metabolici, induzione della vascolarizzazione e formazione di nuovo osso parallelamente alla degradazione del biomateriale. Inoltre, la sterilizzazione dello scaffold non deve alterare le sue proprietà.

I processi di migrazione, proliferazione e differenziamento cellulare, così come la vascolarizzazione e la formazione di nuovo osso, sono tutti eventi che dipendono dalla porosità dello scaffold, l'interconnessione dei pori e dalla rugosità della superficie. Un'eccessiva porosità compromette le caratteristiche meccaniche dello scaffold. Pori con diametro di 200-400 μm sono ottimali per la formazione di neo-vasi e tessuto osseo.³⁷ L'aumento della rugosità di superficie consente una migliore fissazione dello scaffold all'osso, migliorando l'osteointegrazione. Negli ultimi anni è stato approfondito lo studio delle modificazioni della nanotopografia di superficie come mezzo per aumentare la concentrazione di atomi e di cristalli, e il rapporto superficie/volume. Tali modificazioni consentono un maggiore adsorbimento delle proteine dei fluidi tissutali, così come un miglioramento dell'adesione cellulare, della formazione di osso, dell'osteointegrazione e delle proprietà meccaniche dell'osso neoformato.^{38,39}

Alcuni scaffold, fatti di leghe metalliche o polimetilmetacrilato, sono essenzialmente permanenti, mentre altri si degradano in settimane o mesi. Gli scaffold che si degradano in parallelo alla formazione di osso preservano la stabilità meccanica nel sito del difetto osseo; inoltre, durante la degradazione non devono essere rilasciati prodotti tossici, quali sostanze acide che riducono il pH locale causando infiammazione e/o necrosi e disfunzione tissutale.³⁷

La forza meccanica di uno scaffold dovrebbe essere simile a quella dell'osso: scaffolds con una forza meccanica inferiore possono non sopportare i carichi, mentre scaffold con una forza meccanica più elevata possono portare a fenomeni di *stress shielding*, in cui lo stress meccanico viene assorbito dallo scaffold, privando così l'osso della stimolazione da carico, necessaria per il

rimodellamento osseo. In questo contesto il riassorbimento osseo continua ed infine prevale, non essendo bilanciato dalla formazione di tessuto, fino ad arrivare al riassorbimento osseo attorno all'impianto.

Gli scaffold per l'ingegneria tissutale ossea possono differire per la maniera in cui vengono integrati nel tessuto osseo ospite in seguito all'impianto. I materiali bioinerti, come i polimeri sintetici, ad esempio gli impianti di politetrafluoroetilene, vengono inglobati in una capsula fibrosa.⁴⁰ Al contrario, i materiali bioattivi, come i vetri bioattivi, subiscono delle modificazioni chimiche di superficie che ne consentono il legame con l'osso; altri materiali, come l'idrossiapatite, le ceramiche di calcio fosfato e il titanio, consentono la diretta apposizione di tessuto osseo.⁴¹

Gli scaffold possono essere sia preformati che iniettabili. Gli scaffold preformati sono idonei per difetti che richiedono un'elevata forza meccanica o una forma predefinita, come i difetti segmentali delle ossa lunghe, la resezione di tumori o la fusione spinale. Attualmente oggetto di studio è la progettazione di scaffold paziente-specifici basata su dati di CT o MRI.⁴² Gli scaffold iniettabili, in uso dal 1990, includono vari materiali, tra cui i cementi di calcio fosfato⁴³. Tali scaffold devono solidificare in situ in un lasso di tempo clinicamente accettabile; possono avere una scarsa forza meccanica e porosità, quindi il loro utilizzo è indicato per difetti delle ossa trabecolari, non sottoposti a carico, o per piccoli difetti entro strutture ossee intatte⁴⁴. In questo tipo di scaffold i pori possono essere generati rapidamente mediante l'uso di particelle degradabili o bolle gassose⁴⁵

I materiali usati nella preparazione degli scaffold comprendono polimeri naturali o sintetici, ceramiche e compositi. Tra i polimeri naturali troviamo il collagene, l'acido ialuronico, l'alginato e il chitosano. Le loro scarse proprietà meccaniche ne limitano l'uso a siti non sottoposti a carico, come il cranio o la mandibola. Possono essere usati in combinazione con fattori osteogenici,^{46,47} e possono essere rafforzati meccanicamente mediante la combinazione con altri materiali, come l'idrossiapatite o l'acido polilattico.⁴⁸ I polimeri sintetici più usati sono l'acido polilattico, il poliglicolico, il policaprolattone, le polianidridi, i polifosfoesteri e i polifosfazeni. Presentano proprietà meccaniche, strutturali e di

degradazione diverse: ad esempio quelli ad elevato peso molecolare mostrano una più lenta degradazione e quindi un mantenimento nel tempo delle proprietà meccaniche.^{49,50} I polimeri sintetici vengono spesso usati come parte di materiali compositi, in modo da combinare le forze e minimizzare la debolezze di ciascuna componente. Ad esempio l'aggiunta di idrossiapatite all'acido polilattico aumenta la forza del legame impianto-osso.⁵¹ La combinazione di vetri bioattivi e poliesteri biodegradabili consente di neutralizzare la degradazione acidica dei poliesteri e migliora le proprietà meccaniche del vetro bioattivo.⁵²

Le ceramiche, usate clinicamente fin dal 1970, possono essere sia bioattive che inerti. Presentano una elevata resistenza alla compressione, ma sono fragili, quindi il loro utilizzo è ristretto a siti non sottoposti a carico. In ingegneria tissutale ossea le ceramiche usate includono il solfato di calcio e diverse forme di calcio fosfato (CaP), come l'idrossiapatite e il β -tricalcio fosfato. Il calcio solfato si degrada velocemente e viene spesso usato in odontoiatria, mentre l'idrossiapatite e il β -tricalcio fosfato sono stati approvati dalla FDA per gli impianti dentali, ortopedici e come sostituti ossei. Diversi studi hanno dimostrato che nel trattamento di difetti critici i materiali di CaP *in vivo* hanno maggiore stabilità e proprietà osteogeniche rispetto a impianti di osso autologo.^{53,54}

Infine, gli *smart materials* sono materiali che rispondono a segnali in vivo, come temperatura, stress, pH, e trasmettono informazioni regolatorie che portano ad un aumento della formazione di nuovo osso e della vascolarizzazione. Tra questi vi sono i vetri bioattivi, che subiscono delle modificazioni di superficie dopo il contatto con i fluidi interstiziali tali da promuovere la rigenerazione ossea.

Biomimetica del tessuto osseo

Il concetto fondamentale alla base dell'ingegneria tissutale è quello di utilizzare la risposta biologica naturale che si attiva in seguito a un danno tissutale, in coniugazione ai principi di ingegneria. La più ampia conoscenza delle vie di segnalazione cellulare e della loro specifica risposta fa emergere con maggiore

chiarezza il loro ruolo e la loro funzionalità nell'ingegneria tissutale, spingendo biologi e ingegneri a sviluppare materiali bioattivi multifunzionali.

La matrice extracellulare (ECM) naturale supporta la struttura e funzione di organi e tessuti, regola funzioni cellulari di base come la proliferazione, la migrazione, il differenziamento e la sopravvivenza. Tali funzioni sono regolate attraverso costituenti tessuto-specifici come collagene, laminine, elastina, fibronectina e da molecole funzionali come i fattori di crescita. Poiché il contatto delle cellule con la superficie del biomateriale influenza in maniera significativa il comportamento e la *performance* cellulare, la tendenza è quella di progettare materiali bioattivi che possano modulare la risposta cellulare. Negli ultimi anni la progettazione dei materiali si è focalizzata sull'incorporazione di molecole segnale (ligandi per recettori d'adesione e/o parti funzionali di ormoni, fattori di crescita ed enzimi) nello scaffold piuttosto che nel loro utilizzo in forma solubile o per diffusione.^{55,56}

Grazie all'individuazione di sequenze consenso nei domini proteici è stato possibile progettare delle superfici funzionali con elevata specificità di legame, mediante l'utilizzo di frammenti proteici anziché di proteine native. Le proteine native tendono spesso ad assumere una conformazione casuale dovuta alla carica, all'idrofobicità e alla topografia superficiale, rendendo così stericamente inaccessibili i siti di legame ai recettori. I vantaggi dei piccoli peptidi, grazie alle ridotte dimensioni, oltre a poter essere immobilizzati sulla superficie con una densità maggiore, risultano essere la stabilità nel tempo e la resistenza alle procedure di sterilizzazione e alle variazioni di pH.⁵⁷

Per la funzionalizzazione di superficie la sequenza più usata è H-Arg-Gly-Asp-OH (RGD), dominio di segnalazione derivato dalla fibronectina e laminina, presente in numerose proteine della matrice. Sono state ottenute anche superfici biomimetiche inserendo il dominio di legame dell'eparina alle sialoproteine dell'osso o sequenza FHRRKA (Phe-His-Arg-Arg-Ile-Lys-Ala).⁵⁸

Numerosi studi sono stati incentrati su l'utilizzo dei *self assembled monolayers* (SAMs), sequenze peptidiche oligomeriche che hanno la capacità, in opportune soluzioni saline, di organizzarsi in strutture tridimensionali ordinate (foglietti

beta o strutture ad alfa-elica). Tali strutture mimano quelle biologiche, come le varie proteine filamentose che costituiscono la matrice extracellulare; inoltre i SAMs sono stati utilizzati per la creazione di strutture tridimensionali⁵⁹ e per il rilascio di fattori di crescita.⁶⁰

Oltre alla specificità del segnale peptidico, un altro fattore importante è la densità del segnale, che deve essere tale da consentire l'adesione, la distensione (*spreading*) e la proliferazione cellulare. Ad esempio, una densità di 1×10^{-15} mol/cm² di RGD, che significa uno spazio di circa 140 nm fra i peptidi, è sufficiente per lo *spreading* cellulare; una densità di 1×10^{-14} mol/cm², invece, è capace di promuovere la formazione dei contatti focali.⁶¹

Un'altra caratteristica importante per un biomateriale è la bagnabilità superficiale (*wettability*) ovvero l'idrofilia di superficie che può indurre l'adsorbimento di proteine e glucidi che mediano l'adesione cellulare. La maggior parte dei polimeri è di natura idrofobica; per aumentare la *wettability* si usano tecniche di irraggiamento superficiale come la tecnica di *radiofrequency glow discharge*, che impiega masse di gas nobile per modificare la superficie di un materiale. I gas utilizzati sono quelli reattivi, come l'ossigeno, l'azoto, l'elio o non reattivi come l'argon. Il trattamento causa delle ossidazioni, dei cambiamenti elettrostatici e di morfologia di superficie che portano ad un sensibile aumento della idrofilia.

Di recente è emerso un nuovo metodo per modificare e funzionalizzare le superfici, cioè la tecnica di *layer-by-layer adsorption* (LbL). La tecnica si basa sulla deposizione alternata di policationi e polianioni che si auto-assemblano e si auto-organizzano sulla superficie di un materiale formando dei *polyelectrolyte multilayer films* (PEM).⁶² Grazie all'interazione elettrostatica tra polielettroliti di carica opposta è possibile assemblare dei multistrati di diverso spessore, da pochi nanometri a diversi micrometri, che possono essere depositati su vari tipi di substrati, inclusi oggetti sferici, matrici porose o superfici di biomateriali metallici.^{63,64} I PEM sono versatili e facilmente modulabili: variando le condizioni di assemblaggio, quali pH, soluzioni saline, numero di strati, ordine di assemblaggio, etc., vengono variati la morfologia, lo spessore e la struttura interna, tutti elementi che determinano la loro bioattività.⁶⁵

Integrazione osso-impianto

L'interazione cellula-substrato può essere considerata come il fenomeno iniziale che condiziona il successo di un biomateriale *in vivo* e l'applicazione a lungo termine di un impianto *in situ*. Ciò è particolarmente vero per biomateriali creati per fornire stabilità meccanica, che si basano sull'adesione e crescita dei tessuti per la continuità di funzione. Tenere in considerazione il tempo che le cellule impiegano per aderire ad un biomateriale è molto importante, poiché un'adesione tardiva può causare una riduzione della vitalità cellulare. E' quindi l'adesione cellulare alla superficie il meccanismo da cui inizia il processo di integrazione. L'adesione cellulare alla ECM è un processo fondamentalmente mediato dalle integrine, una famiglia di recettori di adesione trans-membrana eterodimerici, costituiti da subunità α e β associate in maniera non covalente, che si legano a specifiche sequenze aminoacidiche, come la sequenza RGD.⁶⁶ L'adesione mediata dalle integrine è un processo altamente regolato che coinvolge l'interazione recettore-ligando, il consolidamento dell'adesione e il successivo 'spreading' cellulare. Dopo il legame con il ligando, l'integrina rapidamente si associa all'actina citoscheletrica e forma dei complessi supramolecolari che contengono proteine strutturali come la paxillina, la vinculina e latalina. Tali complessi sono detti complessi focali e sono degli elementi centrali nel processo di adesione, poichè costituiscono il legame strutturale tra citoscheletro e matrice extracellulare per consentire l'adesione stabile e la successiva migrazione. I contatti focali possiedono una natura transitoria: si organizzano e disorganizzano sulla membrana, secondo la diversità di composizione chimica⁶⁷ e morfologia della superficie.⁶⁸ In combinazione con altri recettori, i complessi focali attivano vie di segnalazione come MAPK e JNK, che regolano la proliferazione cellulare e il differenziamento.⁶⁹ Molte di queste cascate di segnalazione attivate dalle integrine sono necessarie per il commissionamento delle MSC e il differenziamento degli osteoblasti.^{70,71,72} Di recente, su alcuni tipi cellulari è stato

osservato che i primi eventi nel riconoscimento della ECM sono mediati dallo ialuronano della matrice pericellulare.^{73,74} La matrice pericellulare è uno strato altamente idratato che circonda le cellule, costituito da uno scheletro di ialuronano su cui si legano diversi proteoglicani.⁷⁵ Nelle cellule epiteliali la matrice pericellulare media la rapida adesione su diverse superfici, e la perdita dell'integrità della matrice, dopo trattamento con ialuronidasi, enzima che degrada lo ialuronano, ne riduce l'adesione.⁷⁶ Lo ialuronano media l'adesione iniziale mediante "soft contacts" con il substrato, cui segue l'adesione mediata dalle integrine. Il ruolo della matrice pericellulare è quello di riconoscere il substrato adesivo, avvicinare la membrana cellulare alla superficie, e portare le integrine in stretta prossimità del loro ligando associato alla matrice.⁷⁶ È stato dimostrato che lo ialuronano della matrice è responsabile della nucleazione di strutture contenenti paxillina presenti sulla superficie ventrale della cellula;⁷³ inoltre, il trattamento con ialuronidasi comporta la degradazione della *focal adhesion kinase* (FAK),⁷⁷ proteina che interviene nell'organizzazione dei contatti focali e nella segnalazione mediata dalle integrine. Ne deriva quindi che i fattori coinvolti nell'adesione cellulare e il loro meccanismo d'azione assumono un ruolo centrale per lo sviluppo di biomateriali innovativi, al fine di introdurre modifiche di superficie che consentano una modulazione, al livello molecolare, del legame con le cellule. Una superficie modificata, biomimetica, può quindi rappresentare una sorta di matrice extracellulare artificiale in grado di fornire gli stimoli biologici adatti a guidare la formazione di nuovo tessuto: il segnale può essere di tipo generico, ma anche essere selettivo per alcuni tipi cellulari e quindi indurre una risposta specifica.

Risposta cellulare a un nuovo cemento osseo poroso, iniettabile e bioattivo a base di soia e gelatina

Obiettivo dello studio

In campo ortopedico gli eventi traumatici, l'osteoporosi, le neoplasie, le malformazioni congenite, sono tutti eventi che possono portare a grandi perdite di sostanza ossea. Attualmente, nella maggior parte dei casi, il trattamento chirurgico dei difetti ossei avviene mediante l'impianto di protesi artificiali o l'innesto di tessuto prelevato da altri siti del paziente o da donatori. Per sostituire l'impiego di osso autologo o allogenico e di impianti protesici, l'ingegneria tissutale propone la rigenerazione dei tessuti attraverso metodiche innovative, che rappresentano il punto di arrivo delle più innovative conoscenze della biologia e della chirurgia ricostruttiva. L'obiettivo dell'ingegneria tissutale è quello di generare un costrutto funzionale, indistinguibile dal tessuto originale, mimando complessi meccanismi già presenti in natura, che coinvolgono segnali e fattori molecolari in grado di indurre una specifica risposta nell'ospite. Inizialmente lo scopo principale nella progettazione di impianti ortopedici è stato l'utilizzo di materiali biologicamente inerti, che non stimolassero una risposta immunitaria dell'ospite. Negli ultimi vent'anni si è passati dall'utilizzo di materiali inerti a quello di materiali bioattivi, ovvero materiali con proprietà osteoinduttive, capaci quindi di richiamare gli elementi osteogenici, e osteoconduttive, cioè in grado di sostenere la rigenerazione del tessuto. Un sostituto osseo viene quindi pensato, non più come semplice supporto alla neoformazione di tessuto, ma come elemento con elevata capacità di integrazione, proprietà meccaniche simili all'osso nativo, cinetiche di riassorbimento controllate e abilità di indurre l'osteogenesi e l'angiogenesi.

In tale contesto, il contributo della biomimetica nella progettazione degli scaffold per l'ingegneria tissutale risulta essere di notevole importanza, poiché mira a riprodurre l'architettura delle strutture biologiche e a fornire gli stimoli biologici che guidano il processo di rigenerazione tissutale.

In questo studio è stata valutata la risposta cellulare ad un nuovo cemento osseo a base di calcio fosfato, poroso, iniettabile, e biodegradabile. La formulazione del composito ha incluso agenti surfattanti che sono naturalmente bioattivi, quali la soia^{78,79} e la gelatina.⁸⁰ In

particolare è stata valutata la capacità di tali sostanze di migliorare l'iniettabilità e la porosità del cemento e di potenziarne la bioattività, quest'ultima valutando la proliferazione e il differenziamento di cellule coinvolte nella rigenerazione ossea.

Materiale e Metodo

Colture cellulari di linee cellulari simil-osteoblastiche

Come modello di osteoblasti è stata utilizzata la linea cellulare immortalizzata derivata da osteosarcoma Saos-2. Le cellule sono state coltivate in Iscove Medium (Gibco, Milano) addizionato di FBS al 10%, L-glutamina 2 mM, penicillina 100 U/mL e streptomicina 0.1 mg/mL (Gibco) e mantenute in atmosfera umidificata a 37°C e a livelli di CO₂ pari al 5%.

Fosfatasi alcalina

La fosfatasi alcalina (ALP) è stata valutata come marcatore del differenziamento osteogenetico. L'attività dell'ALP è stata misurata con un metodo biochimico basato sulla conversione del p-nitrophenyl phosphate liquid substrate (Sigma-Aldrich, Milano) in p-nitrofenolo. Le cellule sono state lisate con SDS allo 0,01% ed il substrato della reazione (p-nitrofenilfosfato) è stato aggiunto in proporzione 1:1 ai lisati cellulari. Dopo un'incubazione di 15 minuti a 37°C, è stata effettuata la lettura spettrofotometrica dei campioni a 405 nm, utilizzando uno spettrofotometro per micropiastre (Spectra III, Tecan, Austria). L'attività della ALP è stata calcolata per interpolazione dei valori di assorbanza su una curva standard costituita da diluizioni seriali di una soluzione di p-nitrofenolo (range di concentrazione 0-40 mmoli). I risultati sono stati espressi come nanomoli di p-nitrofenolo formato in 1 minuto e normalizzati per il quantitativo totale di proteine dosate con metodo spettrofotometrico (BCA Protein Assay kit, Pierce, Rockford, IL).

Rilascio di collagene

La secrezione di collagene da parte delle cellule è un indice della capacità delle cellule di depositare la matrice extracellulare. Il test è basato sulla marcatura con il colorante Sirius Red (Polysciences, Eppelheim, Germania) che si lega in maniera specifica alle molecole di collagene. Le cellule adese vengono lavate e fissate con fissativo di Bouin (acido picrico in soluzione acquosa satura, formalina ed acido acetico glaciale in rapporto 15:5:1), per 1 ora a temperatura ambiente. Dopo un lavaggio con acqua il campione è stato fatto asciugare all'aria e trattato con la soluzione di Sirius Red allo 0.1% in soluzione satura di acido

picrico per 1 ora in leggera agitazione. E' stato eseguito un lavaggio con HCl 0.01 N per rimuovere il colorante non legato e si procede con l'eluizione del colorante, utilizzando NaOH 0.1 N. Dell'eluato è stata infine eseguita la lettura allo spettrofotometro a 540 nm. Il collagene secreto dalle cellule è stato espresso come valore di densità ottica.

Colture cellulari di cellule endoteliali umane dalla vena ombelicale

Le cellule endoteliali sono state isolate dalla vena ombelicale umana (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) tramite trattamento enzimatico con collagenasi. La vena ombelicale è stata raccolta in una soluzione tamponata (NaCl 140 mM, KCl 4 mM, glucosio 1 mM, H₂KPO₄ 1 mM e Na₂HPO₄ 10 mM); usando un catetere a perfusione è stato eseguito un lavaggio con 20 mL della soluzione tamponata per eliminare il sangue. Le due estremità della vena sono state chiuse e l'interno è stato trattato con collagenasi di tipo IV (Sigma-Aldrich) allo 0,2% in PBS, per 15 minuti a 37°C. Dopo l'incubazione il canale venoso è stato lavato con la soluzione tamponata per eluire il contenuto cellulare che è stato raccolto in un contenitore sterile.

Le cellule sono state lavate due volte col terreno di coltura costituito da RPMI 1640 e Medium 199 (Sigma-Aldrich) in rapporto 50:50, addizionato di FBS al 20%, L-glutamina 2mM, penicillina 100U/mL e streptomina 0.1 mg/mL. Le cellule sono state seminate su fiasche rivestite di collagene I (Biocoat, BD, Milano) e incubate a 37°C e 5% CO₂ in terreno completo.

Caratterizzazione delle HUVEC

La caratterizzazione delle HUVEC è stata eseguita mediante immunofluorescenza per la Ve-caderina, considerato un marcatore delle cellule endoteliali.

Dopo fissazione con paraformaldeide 3,7% per 15 minuti, permeabilizzazione con Triton-X allo 0,1% in soluzione HEPES (Sigma-Aldrich) per 20 min e lavaggio in PBS, le cellule sono state incubate con anticorpo primario anti-Ve-Caderina (Cell Signaling Technology, Boston, USA) alla concentrazione di 0,25 µg/mL in una soluzione di bovina serum albumin (BSA) al 3% in PBS.

Dopo 3 lavaggi in PBS, le cellule sono state incubate con anticorpo secondario anti-topo marcato con AlexaFluor 488 (Invitrogen, Milano) alla concentrazione di 1 µg/mL in una

soluzione di BSA al 3% in PBS, per 1 ora a temperatura ambiente e al buio. I nuclei sono stati marcati con 1 µg/mL di colorante Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich) in PBS per 10 minuti al buio.

Adesione cellulare

Le cellule adese sono state lavate con PBS, fissate con paraformaldeide al 3.7% per 15 minuti, permeabilizzate con Triton-X allo 0.1% in HEPES per 5 minuti e lavate nuovamente con PBS.

Per le Saos-2, la densità cellulare è stata valutata mediante marcatura dei nuclei con Hoechst 33258 alla concentrazione di 1 µg/mL per 10 minuti, mentre la morfologia cellulare è stata evidenziata con colorante Giemsa (Carlo Erba) al 5% in acqua per 20 minuti.

Per le cellule endoteliali l'adesione al substrato è stata valutata mediante colorazione con 6 µg/ml di arancio di acridina (Chroma-Gesellschaft) in PBS per 5 minuti.

Vitalità cellulare

La vitalità cellulare è stata analizzata tramite il saggio Alamar Blue (Serotec, Oxford, UK), secondo le istruzioni fornite dal produttore. L'Alamar Blue è un indicatore redox fluorimetrico/colorimetrico che viene internalizzato dalle cellule e convertito dalla forma ossidata non fluorescente/blu a quella ridotta fluorescente/rossa. L'indicatore non ha alcun effetto tossico sulle cellule, e la sua riduzione, indice dell'attività metabolica, si correla con il numero di cellule vitali. Il mezzo di coltura delle cellule è stato rimosso dai pozzetti e sostituito, in condizioni di sterilità, con terreno fresco contenente un volume di Alamar Blue pari al 10%. Un pozzetto privo di cellule, contenente terreno di coltura e Alamar Blue al 10%, è stato utilizzato come 'bianco' per la correzione dei valori di fluorescenza rilevati nei campioni. Le piastre sono state incubate a 37°C, a livelli di CO₂ pari al 5% per 3 ore e 30 minuti. Al termine dell'incubazione il medium è stato trasferito in una nuova piastra e la fluorescenza rilevata con un lettore per micropiastre (Cytofluor™ 2350, Millipore, Bedford, MA) utilizzando una lunghezza d'onda di eccitazione di 540 nm e di emissione di 590 nm. I risultati del saggio sono stati espressi come media delle unità di fluorescenza relativa (RFU) rilevate in 3 pozzetti.

Preparazione cementi porosi a base di calcio fosfato

I cementi di calcio fosfato (CPC) utilizzati erano costituiti dal 98% di α -tricalcio fosfato (α -TCP) e dal 2% di idrossiapatite (HA, Merck, Darmstadt, Germania). Lo α -TCP è stato ottenuto da una miscela di CaHPO_4 (Sigma-Aldrich) e CaCO_3 (Sigma-Aldrich) trattata a 1400°C per 15 minuti e successivamente raffreddata all'aria. La dimensione media delle particelle di α -TCP, determinata mediante diffrazione laser (LS 13 320 Beckman Coulter), era di $5,43 \pm 1,15 \mu\text{m}$, con area superficiale di $1,23 \pm 0,01 \text{ m}^2/\text{g}$.

La fase liquida era costituita da un idrogel a base di soia sciolto a due diverse concentrazioni, 5 e 20%, in una soluzione acquosa al 2,5% di Na_2HPO_4 (Merck), a cui è stata aggiunta gelatina bovina di tipo B (Bloom250, Rousselot, Francia) alla concentrazione del 5 o 10%, come promotore della coesione, ovvero per evitare la disgregazione del cemento dopo il contatto con l'acqua.⁸¹

Gli idrogel a base di soia sono stati ottenuti dal processo di eliminazione degli acidi grassi della farina di soia. La farina (Infinity Food, East Sussex, UK) è stata posta in agitazione per 2 ore a 50°C in una miscela di solventi costituita da etanolo:acqua:esano in rapporto 80:20:10. La sospensione è stata lasciata sedimentare per 5 minuti e la fase superiore, di esano, è stata eliminata, mentre il rimanente surnatante e la fase solida sono stati separati per decantazione. La fase solida è stata lavata con la miscela di solventi, mentre dal surnatante è stata ottenuta una polvere mediante evaporazione sotto flusso di azoto seguita da una fase di congelamento e scongelamento.

I cementi porosi sono stati preparati miscelando la fase liquida con la polvere di CPC;⁸² la fase liquida è stata resa schiumosa mediante agitazione meccanica per 1 minuto, con un mini-mixer formato da una paletta in acciaio inox, removibile e sterilizzabile, che è stata adattata al sistema rotante. Al fine di consentire il processo di schiumatura, il rapporto liquido/polvere è stato aggiustato secondo la fluidità della soluzione di polimero utilizzata. La composizione ottimale, costituita dal 20% di estratto di soia e 5% di gelatina, è stata selezionata dopo un'attenta caratterizzazione delle proprietà chimico-fisiche del cemento e tenendo in considerazione i risultati relativi alla porosità e all'iniettabilità. Il composito ottenuto è stato caratterizzato in termini di cinetica di reazione, area superficiale specifica, microstruttura, dimensione e distribuzione dei pori. Come controlli sono stati utilizzati un

cemento poroso contenente il 15% di gelatina come agente surfattante nella fase liquida,⁸³ e un cemento compatto senza l'aggiunta di polimeri.

I codici '5S' o '20S' indicano l'aggiunta del 5 o 20% di idrogel di soia alla fase liquida del cemento poroso, e '5G', '10G' o '15G' indicano l'aggiunta di 5, 10 o 15% di gelatina alla fase liquida.

Caratterizzazione dei compositi porosi

L'iniettabilità dei compositi è stata valutata mediante una *Universal Testing Machine* (MTS Bionix 858, USA), misurando la quantità relativa di pasta che era possibile estrarre attraverso una siringa con un'apertura di 2 mm, applicando una velocità costante di 15 mm/min e un carico massimo di 100 N. Il test è stato eseguito 2,5 minuti dopo il miscelamento della due fasi, solida e liquida. La porosità totale è stata misurata mediante un picnometro a mercurio dopo il completamento della reazione di setting, ovvero dopo aver mantenuto i campioni per 12 giorni in soluzione di Ringer a 37 °C.⁸⁴

La dimensione dei pori è stata determinata nel composito dopo il completamento della reazione di setting, mediante un porosimetro ad intrusione di mercurio (MIP; Micromeritics AutoPore IV9500, USA). L'avanzamento della reazione è stato caratterizzato mediante diffrazione a raggi X (XRD; INEL CPS-120, Francia), e l'area superficiale specifica è stata determinata a diversi tempi (0, 2, 8, 24, 168, 288, 648 ore in soluzione di Ringer a 37°C) mediante analizzatore ASAP 2020 (BET; ASAP 2020 Micromeritics). I cambiamenti microstrutturali durante il setting sono stati valutati mediante l'uso di un microscopio elettronico a scansione (Jeol JSM 6400).

La resistenza alla compressione è stata misurata dopo la reazione di setting mediante la *Universal Testing Machine*, ad una velocità di 1 mm/min fino alla comparsa della frattura.

L'analisi statistica dei dati è stata eseguita mediante analisi della varianza (ANOVA).

Studi in vitro

Per gli studi *in vitro* i campioni sono stati preparati usando componenti sterili. Le polveri dei cementi, il Na₂HPO₄ e le polveri di gelatina e soia sono state sterilizzate mediante raggi γ , a 25 KGy per i componenti inorganici e a 8 KGy per i polimeri. La fase liquida è stata ottenuta dissolvendo i componenti in acqua distillata precedentemente autoclavata. Per gli

esperimenti in vitro, tutti i campioni sono stati testati dopo la reazione di setting (12 giorni in soluzione di Ringer a 37°C).

Tossicità del materiale

La tossicità del materiale è stata valutata mediante interazione indiretta. I compositi sono stati iniettati in transwell con pori da 0,45 µm, e mantenuti per 12 giorni in soluzione di Ringer. Le cellule, alla densità di 30.000/pozzetto, sono state seminate in piastre da 24 pozzetti con 500 µl di terreno completo per 5 ore per consentire l'adesione; successivamente i transwell contenenti i cementi sono stati posti sopra i pozzetti in cui erano state seminate le cellule e la bioattività dei cementi è stata testata per contatto indiretto.

La vitalità cellulare è stata valutata a 24, 72 ore e 6 giorni; il rilascio di collagene a 72 ore e 6 giorni, mentre il contenuto di ALP è stato determinato dopo 6 giorni.

Interazione cellule/compositi

Per determinare le proprietà dei compositi, le cellule, alla densità di 50.000, sono state seminate direttamente sui materiali in piastre da 24 pozzetti. Prima degli esperimenti, la superficie del materiale è stata pre-equilibrata in terreno di coltura al 10% di FBS overnight a 37°C. Le cellule a contatto coi materiali sono state coltivate in 1 mL di terreno completo. Come controllo sono state saggiate cellule seminate su piastre di polistirene per colture cellulari (TCPS).

Risultati

Caratterizzazione dei compositi porosi

L'aggiunta di diverse concentrazioni di idrogel di soia e gelatina alla fase liquida ha consentito la produzione di una schiuma liquida stabile che, dopo essere stata mescolata con la polvere di cemento, ha portato alla formazione di una pasta macroporosa. La porosità totale del composito contenente diverse quantità di idrogel di soia e gelatina è riportata in Tabella 2. Il più alto valore di macroporosità è stato ottenuto usando la concentrazione più bassa di gelatina (5%).

Serie	Condizione	Porosità totale	Macroporosità	Iniettabilità
nf-CPC	compatto	53,4 ± 2,1	0	63,1 ± 2,5
5S/5G	poroso	63,9 ± 2,2	22,8 ± 4,7	75,2 ± 0,7
20S/5G	poroso	61,3 ± 0,9	17,4 ± 1,9	96,4 ± 0,6
5S/10G	poroso	61,0 ± 4,2	16,7 ± 8,9	87,2 ± 5,3
20S/10G	poroso	58,4 ± 1,5	11,1 ± 3,2	93,4 ± 0,4

Tabella 2: Porosità totale, macroporosità e iniettabilità dei materiali a diverse concentrazioni di soia e gelatina. L/P=0,65 ml/g.

L'incorporazione della soia nella fase liquida ha migliorato significativamente l'iniettabilità dei compositi, come mostrato nella Tabella 2 e nella curva di iniettabilità (Figura 3). Come si può osservare, anche se sia la soia che la gelatina hanno entrambe aumentato l'iniettabilità dei compositi, l'effetto era notevolmente pronunciato nei compositi arricchiti di soia. Infatti i compositi contenenti il 20% di soia hanno mostrato proprietà di iniettabilità ottimali, mentre nei campioni al 5% di soia, l'aggiunta di quantità crescenti di gelatina ha determinato un aumento proporzionale dell'iniettabilità.

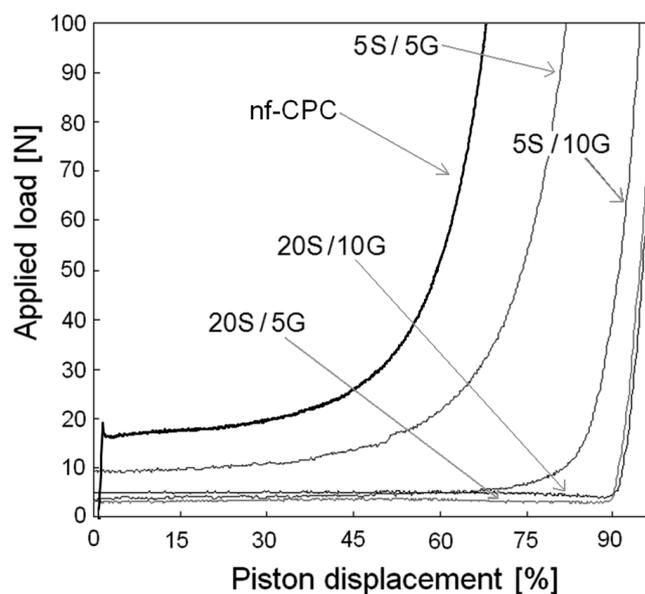


Figura 3: Curve di carico-spostamento durante il saggio di iniettabilità dei compositi contenenti il 5 o 20% di soia (5S or 20S) e il 5 o 10% di gelatina (5G or 10G), preparati con rapporto L/P di 0.65 ml/g. nf-CPC corrisponde al materiale di controllo senza incorporazione di soia o gelatina. Da notare che l'iniezione del composito contenente soia al 20% richiede un carico ridotto.

Sulla base di questi risultati, la formulazione contenente il 20% di soia e il 5% di gelatina, con elevata macroporosità e ottima iniettabilità, è stata selezionata e ulteriormente caratterizzata. Il rapporto liquido/polvere (L/P) è stato aggiustato a 0,55 ml/g per assicurare una buona coesione del composito in modo da poter essere immediatamente iniettato in un mezzo liquido. Un composito a base di gelatina, preparato usando il 15% di gelatina come agente schiumogeno nella fase liquida (**15 G**), è stato usato come controllo. In questo caso, poiché la soluzione presentava una elevata viscosità a causa dell'elevata concentrazione di gelatina, il rapporto L/P utilizzato era di 0,75 ml/g. Come ulteriore materiale di riferimento, è stato caratterizzato un cemento compatto inorganico (**nf-CPC**).

La microstruttura dei compositi a base di soia (**20S/5G**) e di gelatina (**15G**) è mostrata nella Figura 4, dove è chiaramente visibile che, in entrambi i casi, le bolle di aria generate durante la fase di schiumatura della fase liquida persistevano nel processo di solidificazione, fungendo da stampo per composito solido; inoltre sia la quantità che la dimensione dei pori erano simili nelle due composizioni. A maggiore ingrandimento è possibile osservare l'intreccio dei cristalli di idrossiapatite, responsabili del consolidamento dei compositi.

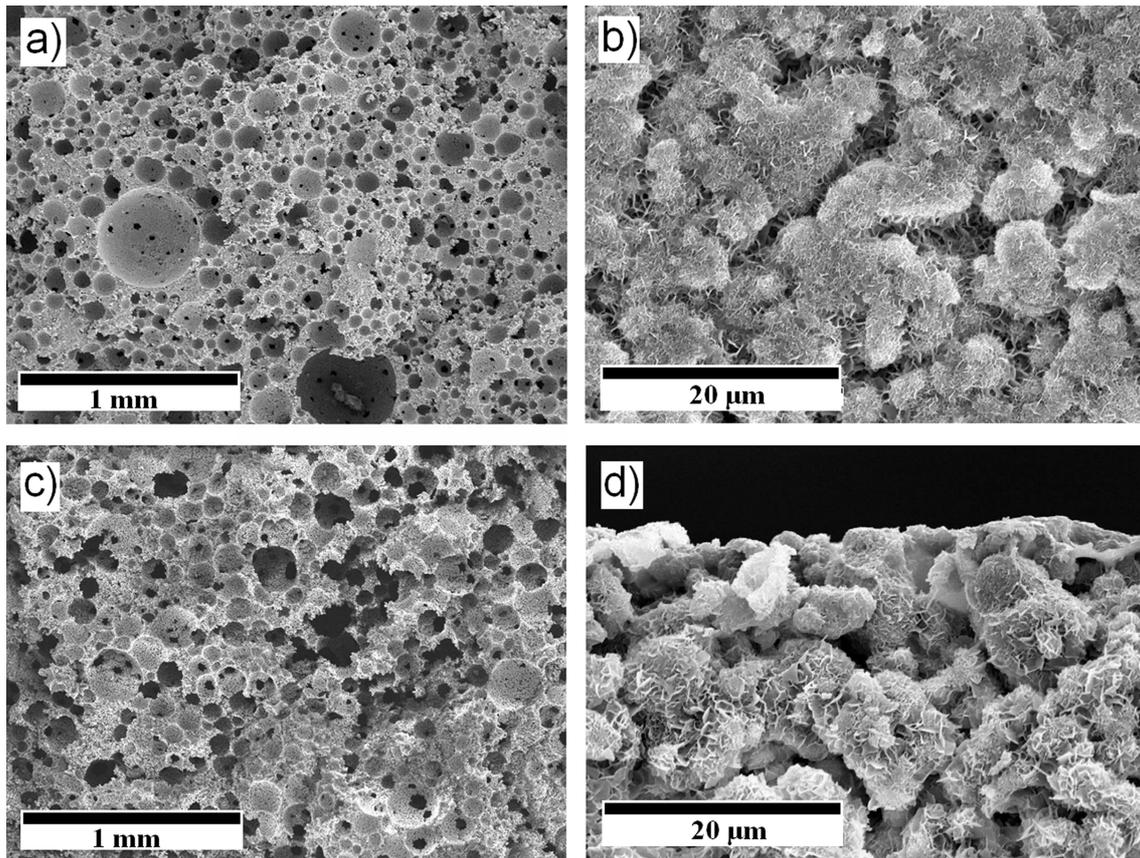


Figura 4: Microfotografie SEM dei compositi preparati con: a) e b) 20% di idrogel di soia e 5% di gelatine nella fase liquida (**20S/5G**), c) e d) 15% di gelatina (**15G**). I compositi erano prima sottoposti a reazione di setting per 12 giorni in soluzione di Ringer.

Nella Figura 5 è riportata la distribuzione dei pori dei tre compositi, determinata mediante MIP. Come atteso, il cemento di controllo (nf-CPC) presentava una distribuzione bimodale, e pori di dimensione sub-micrometrica. Al contrario, il composito 20G/5S mostrava una distribuzione in un range più ampio, con un picco centrato attorno ai 20 μm . La dimensione dei pori rilevata era più piccola rispetto a quella osservata mediante SEM, e questo dipende dal fatto che il MIP misura il diametro di apertura dei pori e non il diametro totale. Il composito 15G, oltre ad una porosità sub-micrometrica, presentava due picchi, di cui uno a 1,3 μm , correlato all'elevato rapporto L/P utilizzato in questa formulazione, ed uno a circa 20 μm , attribuibile al processo di schiumatura.

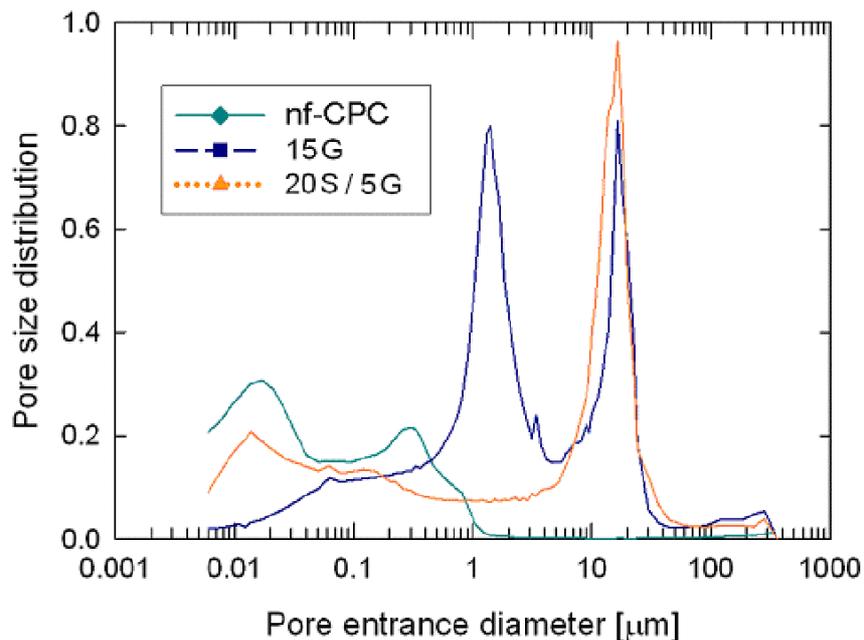


Figura 5: Distribuzione della dimensione dei pori come funzione del diametro dell'apertura del poro misurato mediante MIP.

Come mostrato nella Figura 6a, l'aggiunta dei biopolimeri ha comportato un leggero rallentamento nella reazione di formazione del composito, in particolare durante le fasi iniziali di formazione del composito a base di soia. Dopo 12 giorni non si sono osservate differenze significative nella percentuale di reazione dei diversi composti, con una resa di reazione pari a circa il 95%.

In tutti e tre i materiali è stato osservato un aumento graduale dell'area superficiale specifica (Figura 6b); tale aumento era dovuto alla progressiva precipitazione di nuovi cristalli di idrossiapatite in seguito alla dissoluzione di α -TCP.

L'effetto dei biopolimeri era comunque diverso. Infatti, mentre nei compositi a base di gelatina l'area superficiale specifica aumentava più lentamente (i valori osservati erano sempre inferiori rispetto a quelli osservati per il composito nf-CPC), nei compositi a base di soia l'area superficiale specifica, che presentava valori inferiori nelle fasi iniziali, dopo 24 ore risultava significativamente maggiore rispetto al cemento inorganico (Figura 6b).

La resistenza alla compressione è risultata pari a $2,30 \pm 0,20$ MPa per il composito a base di soia, mentre per il composito a base di gelatina era uguale a $0,35 \pm 0,04$ MPa.

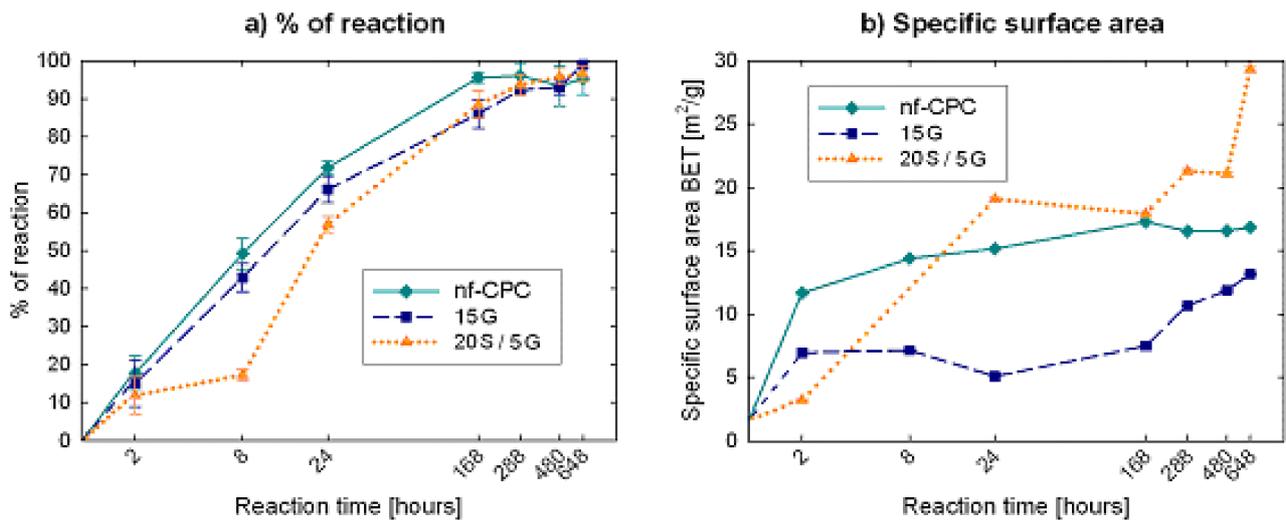


Figura 6: a) percentuale di reazione misurata mediante XRD e b) area superficiale specifica (BET) in funzione del tempo di reazione

Tossicità indiretta dei compositi

Per effettuare un primo screening dei materiali e per ridurre i tempi di sperimentazione, la tossicità indiretta è stata valutata solo sulle Saos-2.

L'effetto indiretto dei compositi è stato valutato mediante l'utilizzo di transwell, cioè di inserti porosi sui quali sono stati iniettati i compositi che, dopo reazione di setting, sono stati posti sopra i pozzetti contenenti le cellule. Le cellule sono state seminate e lasciate in incubazione per 5 ore prima dell'esperimento. La vitalità cellulare è stata analizzata dopo 24, 48 ore e 6 giorni, e, come mostrato nella Figura 7a, su tutti compositi le cellule hanno mostrato valori di vitalità paragonabili al campione di controllo (TCPS), indicando che nessun composito rilasciava degli agenti tossici. Anche per quanto riguarda la funzionalità cellulare, le sostanze rilasciate dai compositi non avevano effetti tossici, né sulla secrezione di collagene che, come riportato nella Figura 7c, presentava valori simili tra tutti i campioni esaminati, né sull'attività dell'ALP. In particolare, per quanto riguarda l'ALP, è stato osservato un aumento significativo della sua attività nelle cellule seminate sul composito a base di soia 20G/5G, sia rispetto agli altri composti esaminati, sia rispetto al TCPS (figura 7b). Questo aumento è probabilmente correlato all'effetto pro-osteogenico degli isoflavoni che vengono rilasciati dal composito a base di soia.

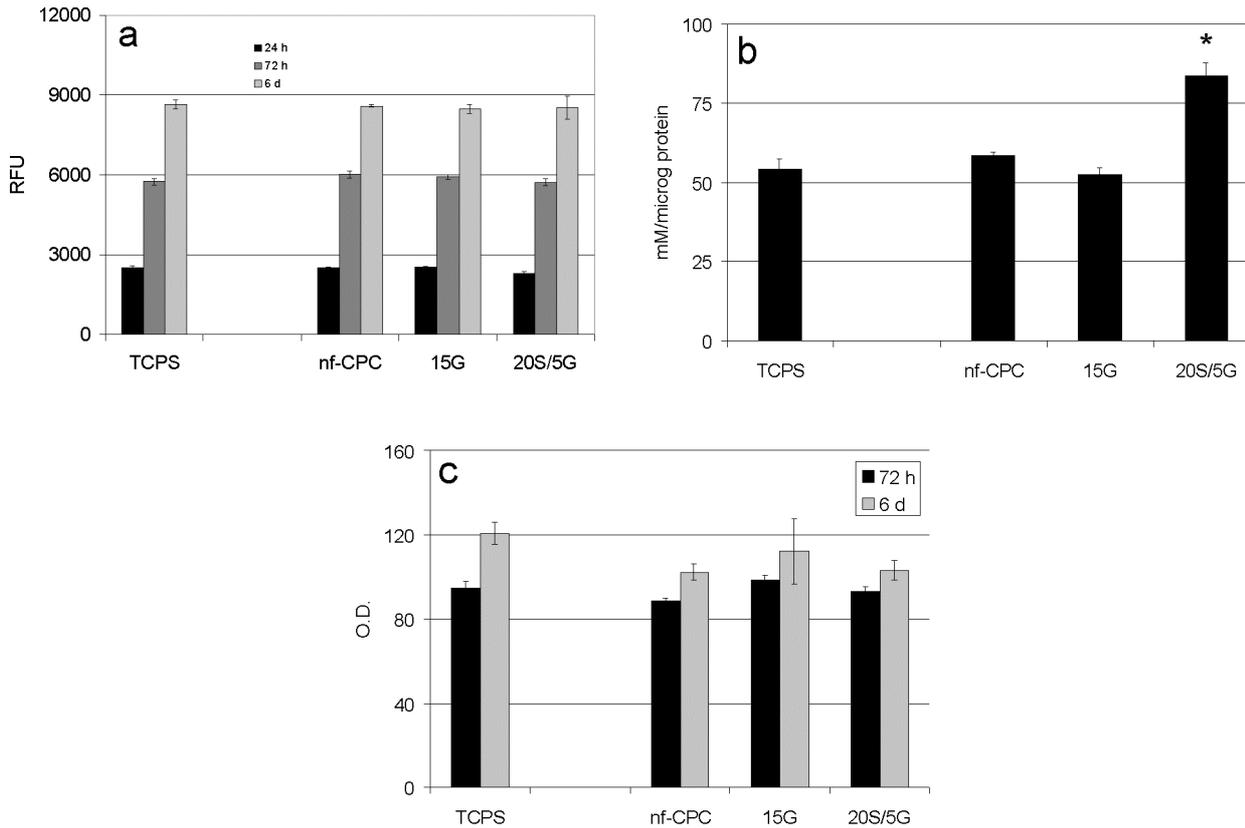


Figura 7: Effetto del contatto indiretto dei compositi sperimentali su: a) vitalità delle Saos-2. I valori riportati come media±errore standard sono espressi come unità di fluorescenza relativa (RFU) (n=3); b) attività dell’ALP delle Saos-2 a 6 giorni. I valori sono riportati come media±errore standard (p<0.05 5G-20S-0.55 vs. tutti; Mann-Whitney test, n=4); c) rilascio di collagene da parte delle Saos-2. I valori riportati come media ± errore standard sono espressi come densità ottica (n=3).

Interazione cellule/compositi

Saos-2

Il contatto diretto cellule/composito è stato valutato a diversi tempi, fino a 8 giorni. Dopo la reazione di setting i materiali sono stati incubati overnight a 37°C con terreno completo, per consentire l’assorbimento di proteine presenti nel siero sulla superficie, al fine di mimare sulla superficie interna ed esterna del materiale lo strato di matrice extracellulare a cui le cellule possono aderire. Le cellule seminate sui compositi erano vitali a tutti i tempi esaminati; in particolare la proliferazione cellulare veniva stimolata quando le cellule sono state messe a contatto con il composito a base di soia, e tale aumento della proliferazione,

riportato nel grafico della Figura 8 in termini di vitalità, è diventato significativo dopo 72 ore dalla semina, sia rispetto al cemento di riferimento sia rispetto al cemento a base di gelatina.

L'attività dell'ALP non ha rivelato differenze apprezzabili tra i diversi compositi, indicando che nessuno dei materiali esaminati influenzava in maniera negativa l'attività di questo enzima (121 ± 25 mM/ μ g proteina su nf-CPC; 139 ± 25 mM/ μ g proteina su 15G; 114 ± 30 mM/ μ g proteina su 20S/5G).

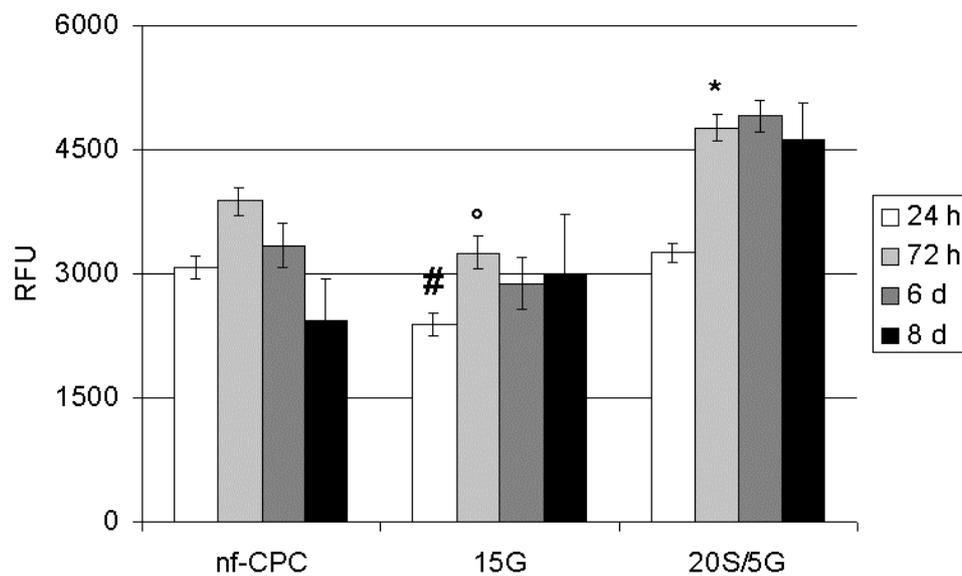


Figura 8: Vitalità cellulare delle Saos-2 seminate sui compositi. I valori, espressi come RFU, sono mostrati come media \pm errore standard (n=3) (# p<0,05 15G vs tutti; ° p<0,05 15G vs 20S/5G; * p<0,05 20S/5G vs nf-CPC).

La colonizzazione dei compositi, analizzata mediante marcatura dei nuclei, ha mostrato che dopo 24 ore le superfici di tutti i compositi erano ricoperte in maniera omogenea dalle cellule (Figura 9).

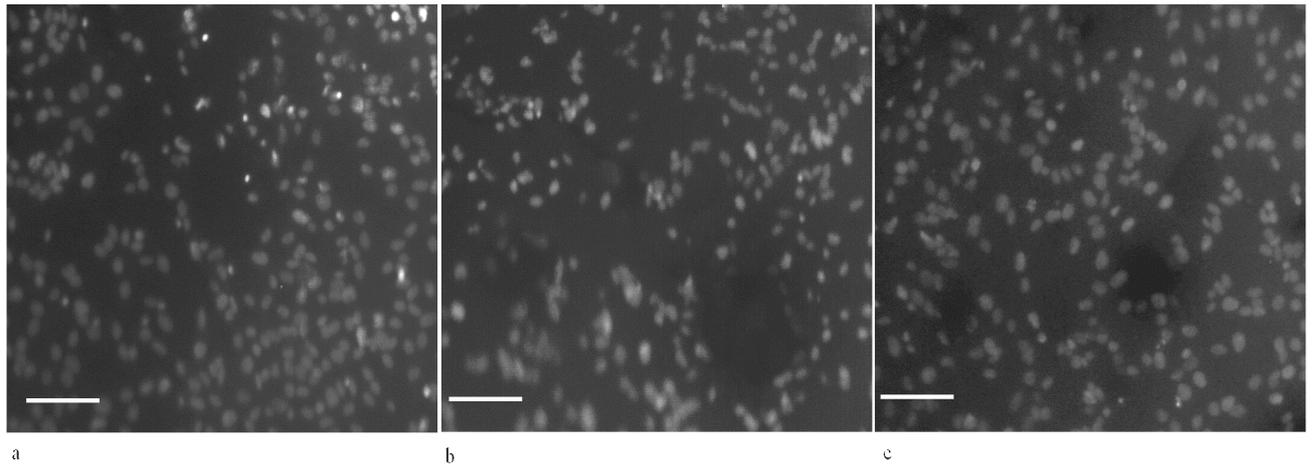


Figura 9: Densità cellulare sui compositi a 24 ore. Colorazione dei nuclei mediante Hoechst 33258. a) nf-CPC; b) 15G; c) 20S/5G (barra = 50 μm , immagini rappresentative).

La morfologia cellulare è stata analizzata mediante microscopio ottico dopo colorazione di Giemsa. Come mostrato nella Figura 10, le cellule erano ben adese e presentavano una morfologia distesa. Numerose cellule erano inoltre presenti nelle regione d'ingresso dei pori, dimostrando la colonizzazione della struttura tridimensionale.

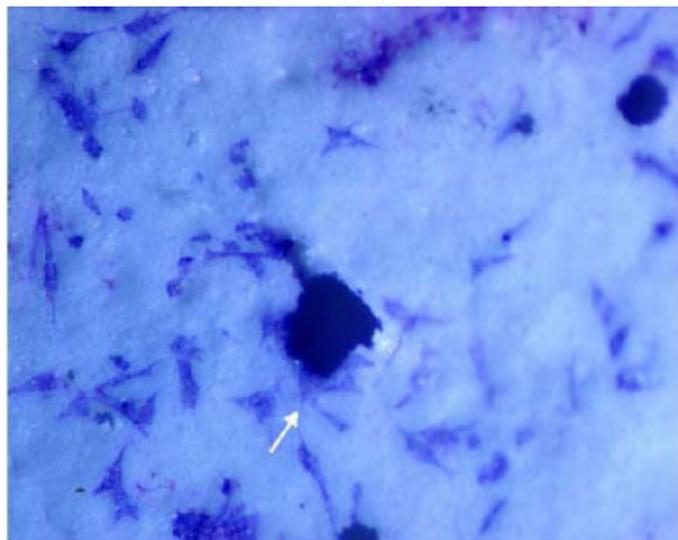


Figura 10: Morfologia cellulare sul composito 20S/5G a 72 ore. Alcune cellule sembrano parzialmente immerse nello spessore del cemento (microscopio ottico 30x, immagine rappresentativa)

Cellule endoteliali (HUVEC)

Dopo essere state isolate dalla vena ombelicale, le cellule, prima di essere utilizzate per gli esperimenti con i materiali, sono state caratterizzate per l'espressione del fenotipo endoteliale, valutando l'espressione della Ve-Caderina. Le VE-caderine, tra i principali marcatori del fenotipo endoteliale, sono molecole di adesione che mediano il contatto cellula-cellula tra cellule endoteliali e giocano un ruolo rilevante nel mantenimento dell'integrità vascolare. La popolazione di cellule isolata dalla vena ombelicale ha mostrato un'ottima marcatura per questa proteina, confermando il fenotipo endoteliale (Figura 11).

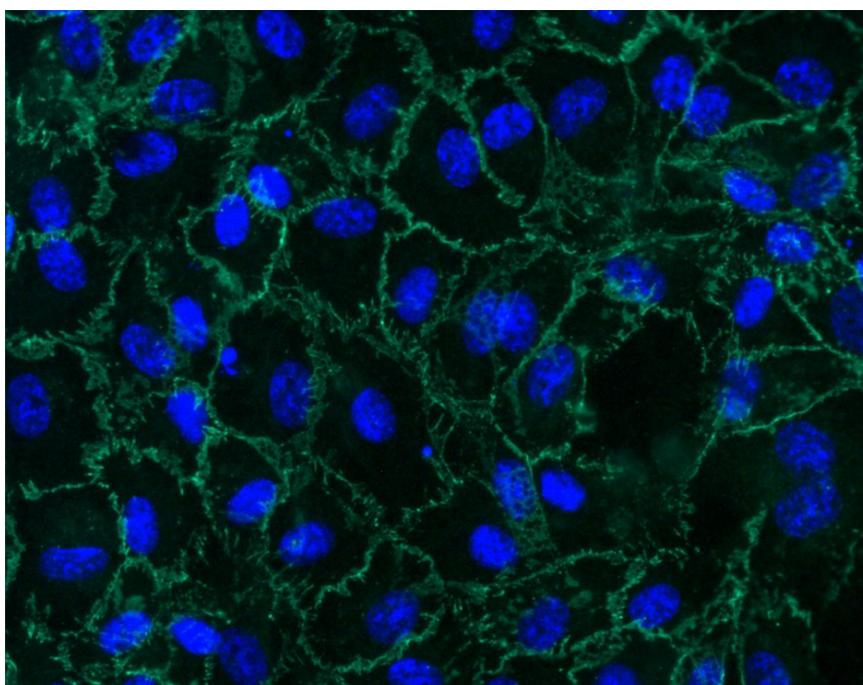


Figura 11: Espressione della Ve-caderina nelle HUVEC. In verde marcatura secondaria della Ve-caderina con AlexaFluor 488, in blu marcatura dei nuclei con Hoechst 33258.

Interazione con i compositi

L'adesione delle HUVEC ai compositi è stata analizzata ai tempi stabiliti mediante marcatura con arancio di acridina, che ha consentito di valutare la morfologia cellulare. Le cellule hanno mostrato un buon grado di adesione su tutti i materiali analizzati, con una morfologia normale e distesa. Come presentato nella Figura 12, le cellule erano numerose e omogeneamente distribuite su tutti i compositi, entrando in stretto contatto con i materiali

fino a colonizzare anche i pori (figura 13). Nel grafico della Figura 14 sono riportati i dati relativi alla vitalità cellulare, che mostrano come il contatto con i materiali non aveva effetti negativi sulla vitalità delle HUVEC. In particolare, a differenza degli altri composti, che presentavano valori sovrapponibili al TCPS, per il composito a base di soia è stato osservato un aumento significativo della vitalità, sia a 24 che a 48 ore, rispetto al TCPS e agli altri materiali studiati.

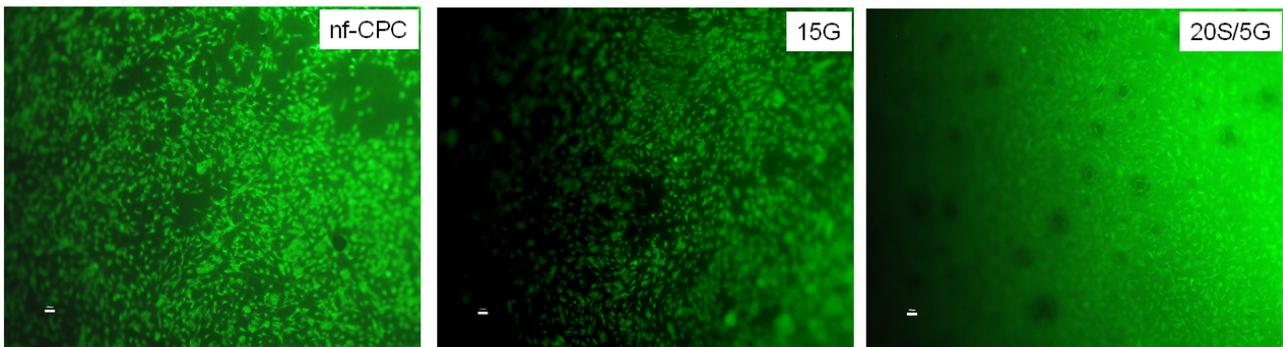


Figura 12: Adesione di HUVEC sui compositi a 72 ore (arancio di acridina, 4x)

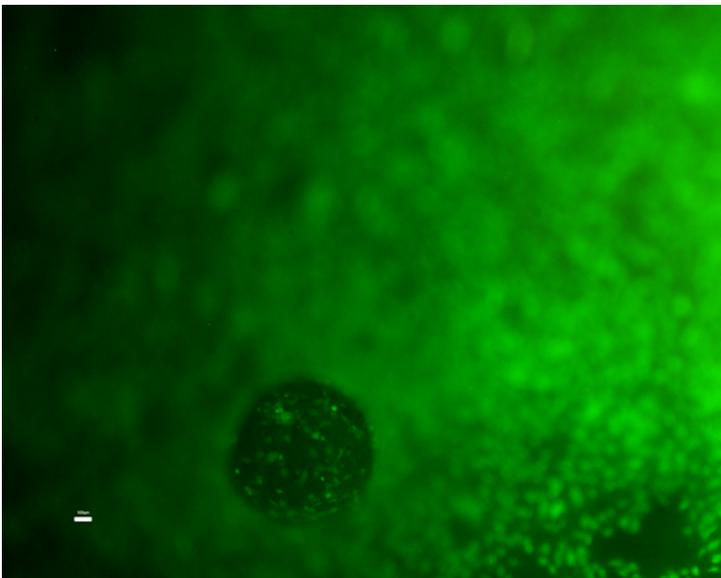


Figura 13: Colonizzazione a 72 ore delle HUVEC sul composito 20S/5G: da notare come le cellule siano infiltrate all'interno dei pori (immagine rappresentativa, arancio di acridina, 10x).

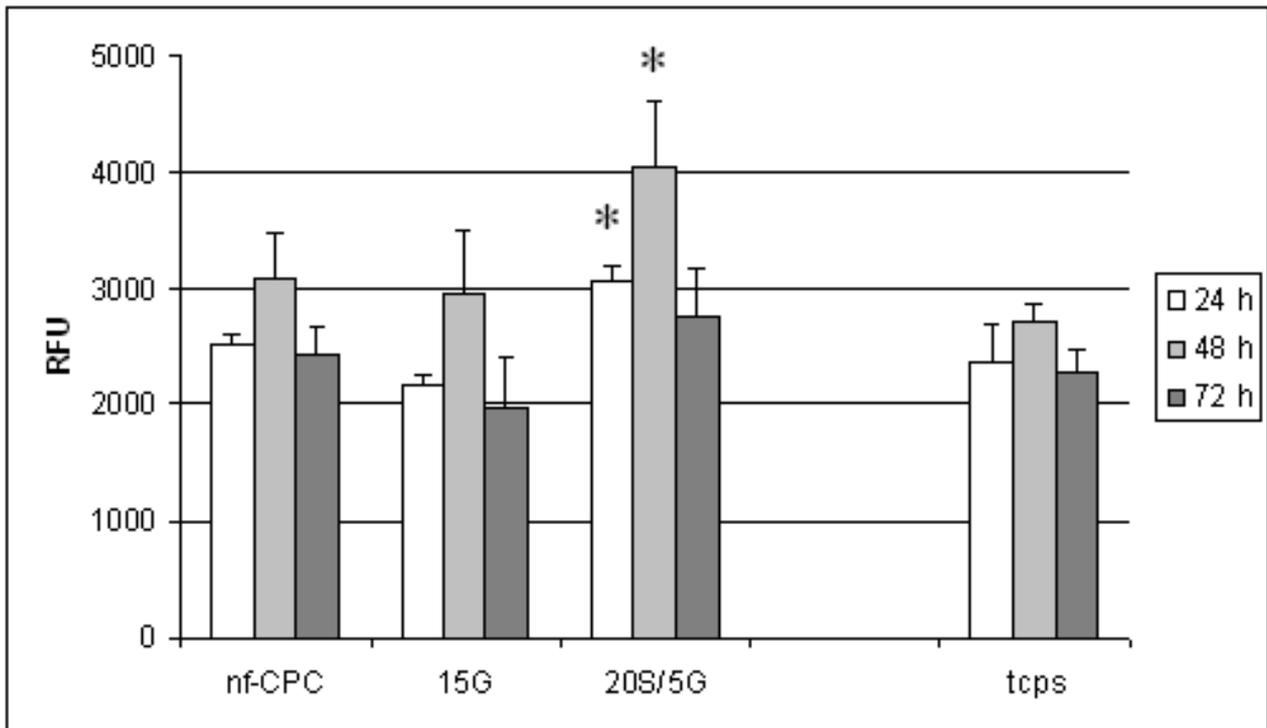


Figura 14: Vitalità cellulare di HUVEC seminate sui diversi compositi. I valori, espressi come RFU, sono mostrati come media \pm errore standard (n=3) (* $p < 0,05$ 20S/5G vs tutti).

Discussione e Conclusioni

Nell'ambito dell'ingegneria tissutale, lo sviluppo di scaffold porosi, sia di origine naturale che artificiale, è riconosciuto come un importante obiettivo. Numerosi scaffold sono stati progettati per favorire l'adesione, la proliferazione e la funzionalità specifica delle cellule. Tra le caratteristiche più importanti e critiche di uno scaffold sono la porosità e l'interconnessione dei pori, necessarie per consentire la formazione del tessuto. La porosità ideale di uno scaffold deve rientrare in un range critico, tale da consentire la proliferazione cellulare, la formazione di nuova matrice extracellulare e da mantenere l'integrità meccanica mentre lo scaffold viene riassorbito. Numerosi autori hanno studiato l'uso di diversi scaffold porosi soprattutto per la rigenerazione cartilaginea e ossea,^{85,86} ma l'obiettivo di sviluppare uno scaffold che presenti tutte le le caratteristiche ideali per l'ingegneria tissutale non è stato ancora raggiunto.

La soia è un composto naturale costituito principalmente da proteine e carboidrati, da oli e isoflavoni. Quest'ultimi sono dei fitoestrogeni, come la genisteina e la daidzeina, che oltre ad esercitare un'attività estrogena sulle cellule, sono capaci di indurre il differenziamento degli osteoblasti.⁷⁸ I fitoestrogeni sono abbondanti nella soia in forma glicosilata, inattiva. Quando entrano in contatto con i fluidi corporei, vengono de-glicosilati e quindi attivati, assicurando un'attività protratta sui tessuti. Il metodo seguito in questo studio per la preparazione dei cementi macroporosi non è un metodo nuovo, ma è stato già utilizzato in passato, impiegando come agenti schiumogeni, surfattanti sintetici⁸⁷ o proteine. Tuttavia, l'uso di polimeri derivati dalla soia rappresenta un notevole vantaggio, poiché oltre alla loro azione di agenti schiumogeni, vengono sfruttate anche le loro proprietà fluidificanti e il loro potenziale osteogenico. L'aggiunta di un idrogel di soia nella fase liquida del cemento porta alla fluidificazione della pasta, permettendo l'uso di un rapporto liquido/polvere più basso, 0,55 ml/g, rispetto a quello utilizzato per i cementi a base di gelatina, pari a 0,75 ml/g. Un rapporto liquido/polvere ridotto consente di sintetizzare un composito con una elevata resistenza alla compressione, pur preservando la macroporosità (Figure 4-5). L'aumento della resistenza può essere dovuto alla riduzione della microporosità, come mostrato nella Figura 5, dove, nel composito a base di soia, il picco a 1 μm era assente. Inoltre, la

maggior fluidificazione di tale composito induceva un significativo aumento delle proprietà di iniettabilità (Figura 3).

Un'altra interessante caratteristica da sottolineare è l'organizzazione strutturale dei pori. Durante la preparazione della fase liquida si sono formate grandi bolle, di dimensioni superiori ai 100 μm (Figura 4), che persistevano anche dopo la reazione di setting dei materiali, entrando a far parte delle porosità intrinseca dei compositi. Infatti, mentre il cemento compatto presentava una porosità intrinseca pari al 54% (Tabella 1) con pori di dimensioni inferiori a 1 μm (Figura 3), nei compositi a base di soia e gelatina si osservava un aumento della porosità totale fino ad un valore pari al 61,3%. È inoltre importante notare che l'uso combinato di soia e gelatina non influiva sulla reazione di setting del cemento a base di α -TCP, anche se è stato riscontrato un ritardo non significativo nell'avanzamento della reazione.

I biopolimeri hanno influenzato la microstruttura dei cristalli di idrossiapatite calcio-deficiente (CDHA); infatti mentre l'area superficiale specifica del composito a base di gelatina era più piccola rispetto a quella del cemento di riferimento, il composito a base di soia e gelatina presentava un'area superficiale specifica pari al doppio di quella del cemento di controllo. Tale osservazione suggerisce un aumento della nucleazione dei cristalli, portando alla formazione di un *network* di cristalli più piccoli. L'utilizzo di polimeri derivati dalla soia risulta inoltre vantaggioso perché ci si aspetta che possano aumentare l'attività osteogenica dei cementi.

L'effetto dei compositi iniettabili *in vitro* è stato studiato su cellule coinvolte nella rigenerazione ossea. In particolare, come modello di cellule osteoblastiche sono state usate le Saos-2: tali cellule, caratterizzate da un fenotipo di tipo osteoblastico maturo, sono ampiamente utilizzate negli studi di differenziamento, proliferazione e metabolismo delle cellule ossee. Per valutare l'effetto dei cementi su cellule angiogeniche sono state invece allestite colture primarie di cellule endoteliali isolate dalla vena ombelicale (HUVEC), che rappresentano un modello cellulare ben caratterizzato e utilizzato per studi relativi alla rigenerazione ossea.⁸⁸ Lo screening iniziale dei composti è stato eseguito solo sulle Saos-2, valutando l'effetto di tossicità indiretta dei compositi. I saggi biochimici hanno mostrato che la vitalità delle cellule poste a contatto indiretto con i compositi era paragonabile al controllo, il TCPS, suggerendo che i compositi non rilasciano sostanze tossiche per le

cellule. Per quanto riguarda il contatto diretto, tutti i materiali erano capaci di supportare l'adesione e la proliferazione sia delle Saos-2 che delle HUVEC. In particolare, i compositi a base di soia inducevano un aumento significativo della proliferazione delle cellule endoteliali sia rispetto agli altri materiali esaminati, sia rispetto a TCPS, un effetto probabilmente dovuto al rilascio degli isoflavoni. Per quanto riguarda l'effetto sulle Saos-2, i valori di vitalità osservati su tutti i cementi, anche se non significativi, erano più bassi rispetto al TCPS; questo risultato è stato ampiamente riportato in letteratura in studi su ceramiche e cementi.^{89,90} Esso potrebbe essere dovuto alle caratteristiche della topografia di superficie dei cementi, che spingerebbe le cellule verso un fenotipo più differenziato piuttosto che proliferante.⁹¹ Quando venivano confrontati compositi porosi e cemento compatto, la vitalità delle Saos-2 era più alta sul composito 20S/5G, suggerendo che i polimeri derivati dalla soia hanno effetto anche su queste cellule. In generale si può ipotizzare che il rilascio di isoflavoni avvenga lentamente, in quanto l'aumento della proliferazione, in particolare per le Saos-2, è evidente dopo 72 ore di coltura. Un relativo aumento della proliferazione e del differenziamento era osservabile anche sul composito a base di gelatina. Tale proprietà è probabilmente data dalla presenza di bioligandi, come la sequenza RGD, che sono in grado di legare i recettori delle integrine cellulari. In tutti i casi, le cellule hanno mantenuto una morfologia normale, e molte cellule sono state in grado di stabilire con il materiale forti contatti; i loro filopodi infatti erano in grado di penetrare all'interno dei pori del materiale. Non sono state osservate differenze significative tra i diversi materiali, questo probabilmente perché tale comportamento è attribuibile alle proprietà della ceramica piuttosto che dalla presenza dei biopolimeri. L'attività dell'ALP e la produzione di collagene sono state valutate in quanto marcatori dell'attività cellulare e del differenziamento in senso osteoblastico. Rispetto agli altri composti, sul composito a base di soia le Saos-2 mostravano un significativo aumento dell'attività dell'ALP. Come già riportato, tale effetto è presumibilmente dovuto agli isoflavoni, come la genisteina, che vengono rilasciati dalla soia.

In conclusione, la bioattività intrinseca e le proprietà schiumogene della gelatina e della soia sono state applicate con successo allo sviluppo di un nuovo composito iniettabile, le cui caratteristiche sono idonee per la chirurgia mini-invasiva per la rigenerazione ossea. Le applicazioni cliniche possono beneficiare dell'uso di questi nuovi cementi, riducendo l'invasività e aumentando il potenziale di rigenerazione tissutale.

Caratterizzazione dell'adesione cellulare su substrati carichi

Obiettivo dello studio

La seconda parte di questa tesi è stata incentrata sullo studio dell'interazione cellula-substrato, e in particolare sull'adesione, poiché questo è il primo evento cellulare che si verifica quando una cellula entra in contatto con la superficie di un materiale. L'adesione cellulare è un processo fondamentale; infatti il tipo di legame che si stabilisce tra recettore e ligando di superficie determina l'organizzazione del citoscheletro, lo spreading e la successiva migrazione cellulare. È chiaro quindi che la fine modulazione degli eventi iniziali di interazione rappresenta un'importante sfida nel campo dei biomateriali. L'adesione cellulare è un evento multiparametrico che può essere influenzato da numerosi fattori, come il riconoscimento specifico delle sequenze peptidiche presenti nelle proteine della matrice extracellulare, la topografia e l'idrofobia di superficie. Per migliorare l'interfaccia dei biomateriali sono state sfruttate diverse metodologie, come l'impiego di tecniche di irraggiamento per indurre l'aumento dell'idrofilia di superficie, o ancora, l'immobilizzazione di proteine e peptidi.

In questo studio è stato valutato l'utilizzo di composti facilmente modulabili, quali i *polyelectrolyte multilayer films* (PEM), come elementi biomimetici per migliorare l'adesione cellulare. In particolare sono stati valutati due PEM: la *poly(ethylene imine)* (PEI), a carica positiva, e il *poly(styrene sulfonate)* (PSS), a carica negativa, per valutare il ruolo della carica di superficie nel processo di adesione cellulare. L'interazione cellulare con i PEM è stata valutata a tempi brevi, ponendo particolare attenzione al ruolo che la matrice pericellulare svolge in questo processo. L'effetto dei PEM sull'adesione cellulare è stato inoltre confrontato con quello di proteine della matrice extracellulare quali la fibronectina e il collagene di Tipo I.

Materiale e Metodo

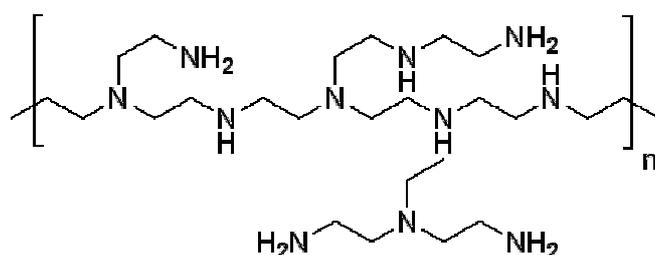
Preparazione dei substrati

La fibronectina (1 mg/ml, Sigma) è stata ricostituita con 0,5 ml di acqua sterile e lasciata per 30 minuti a temperatura ambiente. Il collagene umano di Tipo I (1 mg/ml, Sigma) è stato ricostituito con acido acetico 0,1 M, filtrato, mescolato per 60 minuti a temperatura ambiente e conservato in frigo a +4°C. La concentrazione di lavoro utilizzata per entrambi è stata di 5 µg/ml. Le soluzioni di lavoro vengono diluite in PBS, depositate sulla superficie dei pozzetti da rivestire e incubate per tutta la notte a 4°C.

Preparazione dei polielettroliti

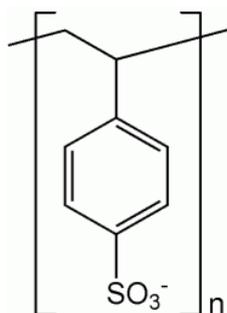
I polielettroliti sono polimeri che possiedono gruppi ionizzabili. In solventi polari, come per esempio l'acqua, questi gruppi possono dissociarsi, mantenendo le cariche sulle catene polimeriche e rilasciando i controioni in soluzione. I polielettroliti utilizzati in questo lavoro sono stati la polietilenimmina (carica positiva) e il olistirene solfonato (carica negativa).

La polietilenimmina (PEI) ha un peso molecolare di 60.000 kD e la seguente formula di struttura:



La PEI è un polielettrolita comunemente usato come strato ancorante nella formazione di film multistrato, poiché grazie alla sua composizione chimica e struttura facilita la crescita di film con la tecnica *layer-by-layer*.

Il poli(stirene-4-solfonato) (PSS) ha peso molecolare di 70.000 kD e formula di struttura come segue:



I polielettroliti sono stati disciolti in acqua a purezza Millipore ad una concentrazione di 1 mg/ml. I substrati precedentemente trattati con etanolo sono stati incubati con le soluzioni di polielettroliti per 15 minuti, quindi lavati abbondantemente con acqua Millipore e asciugati in aria.

Al fine di preparare dei campioni omogenei con carica positiva o negativa, è stato effettuato un adsorbimento *layer-by-layer*. In particolare, per il PEM carico positivamente sono stati depositati tre strati PEI-PSS-PEI (denominato **PEI**), mentre per avere un substrato con carica negativa sono stati depositati 2 strati PEI-PSS (denominato **PSS**). Poiché le superfici di vetro trattate UV-O₃ sono cariche negativamente, il primo strato depositato è il PEI, che, essendo carico positivamente, forma un monostrato di qualche nanometro per interazione elettrostatica.

I substrati utilizzati sono stati sottoposti ad un trattamento UV-O₃ per 30 minuti per eliminare dall'interfaccia tutte le specie carboniose presenti sulla superficie. I campioni così ottenuti sono stati lavati abbondantemente con acqua Millipore e asciugati sotto flusso di azoto.

Le superfici rivestite coi polielettroliti sono state caratterizzate mediante spettroscopia fotoelettronica a raggi X (XPS) e microscopia a forza atomica (AFM).

Colture cellulari

Come modello cellulare sono state utilizzate le linee immortalizzate di osteosarcoma Saos-2, MG-63 e U 2 OS. Le cellule sono state coltivate in Iscove Medium (Gibco, Milano) addizionato di siero di vitello fetale (FBS) al 10%, L-

glutamina 2 mM, penicillina 100 U/mL e streptomicina 0.1 mg/mL (Gibco), e mantenute in atmosfera umidificata a 37°C e a livelli di CO₂ pari al 5%.

Particle exclusion assay

Per visualizzare la matrice pericellulare le cellule sono state seminate alla densità di 30.000/cm² e dopo 24 ore è stata aggiunta una sospensione di eritrociti di montone fissati (Sigma) alla concentrazione di 1x10⁷. Le particelle sono state fatte depositare per 15 minuti in incubatore e le cellule sono state osservate mediante microscopia a contrasto di fase.

Microscopia time-lapse

L'evoluzione dell'interazione tra le cellule e i polielettroliti è stata valutata mediante microscopia time-lapse, utilizzando un microscopio rovesciato dotato di camera incubatrice (Nikon). In particolare, le cellule sono state seminate sui polielettroliti alla concentrazione di 20.000/ cm² e poste in osservazione dopo 1 ora dalla semina. Sono stati scelti cinque campi per ciascuna condizione, e le immagini sono state acquisite ogni 10 minuti per cinque ore mediante una videocamera ad alta risoluzione.

Trasfezione cellulare

La trasfezione con plasmide è stata eseguita mediante elettroporazione con Microporator MP-100 Digital Bio. Le cellule MG63 sono state pretrattate con terreno senza antibiotico per 24 ore, e successivamente staccate dalla fiasca di coltura con tripsina-EDTA e contate. 500.000 cellule sono state lavate con PBS e risospese in resuspension buffer. A queste sono stati aggiunti 0,5 µg di DNA plasmidico contenente *Green Fluorescent Protein* (GFP). La sospensione cellulare è stata poi sottoposta a 3 impulsi di 1300 Volt di 10 millesecondi ciascuno e infine seminata in 2 pozzetti di una piastra da 6 pozzetti. Dopo 48 ore dalla trasfezione, le cellule sono state staccate e seminate per la marcatura della matrice pericellulare.

Marcatura della matrice pericellulare

Le cellule trasfettate con plasmide contenente GFP sono state staccate con tripsina-EDTA e contate tramite la camera di Burker. 20.000 cellule/0,8 cm² sono state seminate in terreno completo sui diversi substrati. Dopo 30 minuti le cellule sono state incubate con un terreno contenente 2µg/ml di biotinylated Hyaluronic Acid Binding Protein (bHABP, Northstar-Seikagaku, Giappone), che si lega in maniera specifica all'acido ialuronico, e mantenute per 2 ore in incubatore. Dopo un lavaggio in PBS le cellule sono state trattate con 5 µg/ml di Streptavidin-Alexafluor 586 (Molecular Probes, Milano) per 30 minuti in incubatore. Allo scadere dell'incubazione è stato eseguito un lavaggio in PBS e le cellule vengono immediatamente osservate al microscopio confocale (Eclipse E600, Nikon). La matrice pericellulare appare rossa rispetto al corpo cellulare marcato in verde dalla GFP. Per verificare la specificità della marcatura, un campione per ogni condizione saggiata, dopo la marcatura stessa, è stato trattato con ialuronidasi.

Immunofluorescenza per le molecole di adesione

Le MG63 sono state seminate alla densità di 25.000/cm², e dopo 6 ore, le cellule sono state fissate in 3% paraformaldeide + 2% saccarosio in PBS per 10 minuti su ghiaccio. Dopo un lavaggio in PBS, le cellule sono state permeabilizzate con la soluzione Hapes-Triton X-100 allo 0.5% per 10 minuti su ghiaccio. Per bloccare i siti di legame aspecifici le colture sono state incubate con PBS + 0.5% BSA + 10% FBS per 15 minuti a temperatura ambiente. Per la marcatura specifica di vinculina, paxillina e integrina β1 sono stati usati anticorpi primari specifici, rispettivamente mouse anti-vinculin (Sigma) 1:400, 2 µg/ml di rabbit anti-paxillin (Santa Cruz) e 20 µg/ml di mouse anti-integrin β1 (Santa Cruz) diluiti in PBS + 0.2% BSA, e mantenuti a temperatura ambiente per 1 ora. Il segnale è stato rilevato mediante l'uso di anticorpi secondari specifici legati a fluoresceina. Contemporaneamente è stata valutata l'organizzazione del citoscheletro mediante colorazione con falloidina-TRITC (Sigma) che marca in

rosso l'actina, alla concentrazione di 0,5 $\mu\text{g/ml}$, al buio per 45 minuti. I campioni sono stati montati e osservati al microscopio confocale (Eclipse E600, Nikon) usando un obiettivo ad immersione 60x per evidenziare la localizzazione delle molecole di adesione e dei filamenti di actina. Il citoscheletro risulta rosso, mentre le varie molecole di adesione appaiono verdi.

Trattamento con ialuronidasi

Per rimuovere la matrice pericellulare le cellule sono state sottoposte a trattamento con ialuronidasi da *Streptomyces hyalurolyticus* (Sigma), enzima che degrada lo ialuronano tagliando i legami glicosidici della β -N-acetilglucosammina [1-4].

Per il test di esclusione delle particelle e marcatura della matrice pericellulare mediante bHABP, 30 minuti prima dell'osservazione il mezzo di coltura è stato sostituito con terreno contenente 2 U/ml di ialuronidasi. Per gli altri esperimenti le cellule sono state pretrattate con ialuronidasi 5 U/ml per 15 minuti in incubatore e poi seminate sui vari substrati e mantenute in terreno contenente ialuronidasi 2 U/ml.

Risultati

Caratterizzazione dei polielettroliti

L'analisi delle superfici su cui erano stati depositati i polielettroliti è stata eseguita mediante XPS e AFM. L'analisi XPS è una tecnica analitica molto utilizzata a questo scopo perché presenta elevata sensibilità alle strutture chimiche prossime alla superficie (0.5-8 nm), e consente un'analisi qualitativa dei gruppi chimici presenti sui substrati.

Negli spettri XPS riportati nella Figura 15, in particolare quello relativo al doppio strato PEI-PSS, si osserva la presenza dei picchi dell'ossigeno 1s a circa 532 eV, dell'azoto 1s a circa 400 eV, del carbonio 1s a circa 285 eV, dello zolfo 2p intorno a circa 164 eV e infine del silicio 2p a circa 100 eV. Nello spettro relativo al multistrato PEI-PSS-PEI sono presenti gli stessi picchi per quanto riguarda l'ossigeno, il carbonio e il silicio, mentre il picco relativo all'azoto risulta essere più intenso in seguito alla presenza di due strati di PEI che hanno il gruppo imminico, risulta essere completamente assente del picco relativo allo zolfo, essendo coperto da uno strato di PEI. Quindi i picchi che permettono di determinare la presenza del PEI e del PSS sono rispettivamente l'azoto e lo zolfo. È stato inoltre calcolato il potenziale sui diversi monostrati adsorbiti sulla superficie. La misura è stata effettuata in sequenza ed è stato misurato il potenziale di quattro polielettroliti due carichi positivamente (PDDA e PEI) e due carichi negativamente (PSS e PMA). Come riportato nella Figura 16, è distinguibile la differente carica presente sulla superficie, infatti mentre il PEI presenta un potenziale di 0.2V, il PSS ha un potenziale di -0.1V. È inoltre evidente la differenza di carica fra i polielettroliti carichi positivamente: il PEI risulta essere un polielettrolita più forte rispetto al PDDA.

L'analisi AFM permette di osservare la morfologia della superficie e valutare quindi la sua omogeneità o la presenza di aggregati. Entrambi i polielettroliti ricoprivano in maniera omogenea la superficie; anche i valori di rugosità (R_a) calcolati erano pari a $0,18 \pm 0,00$ nm sia per il PSS che per il PEI.

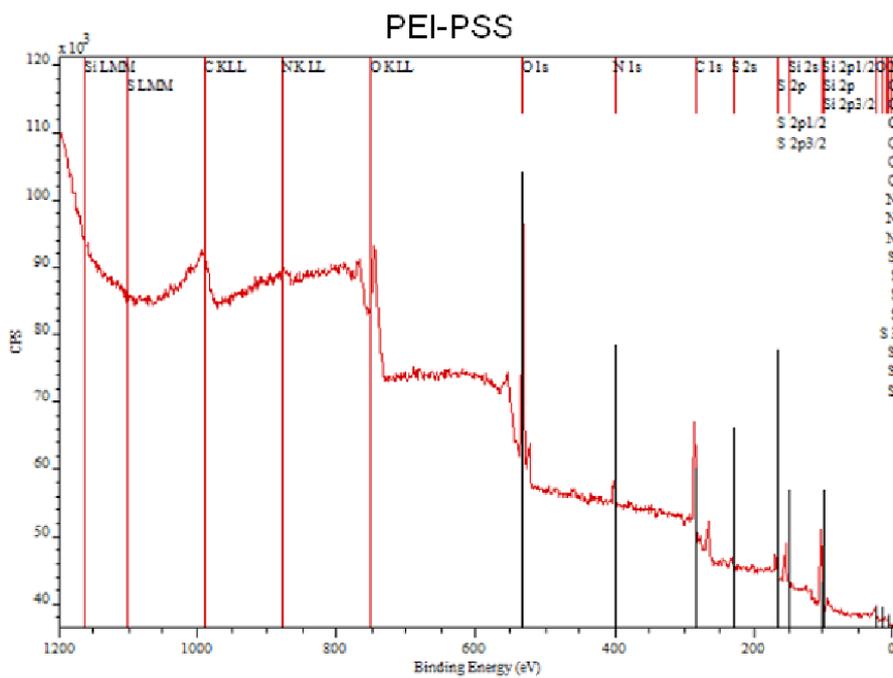
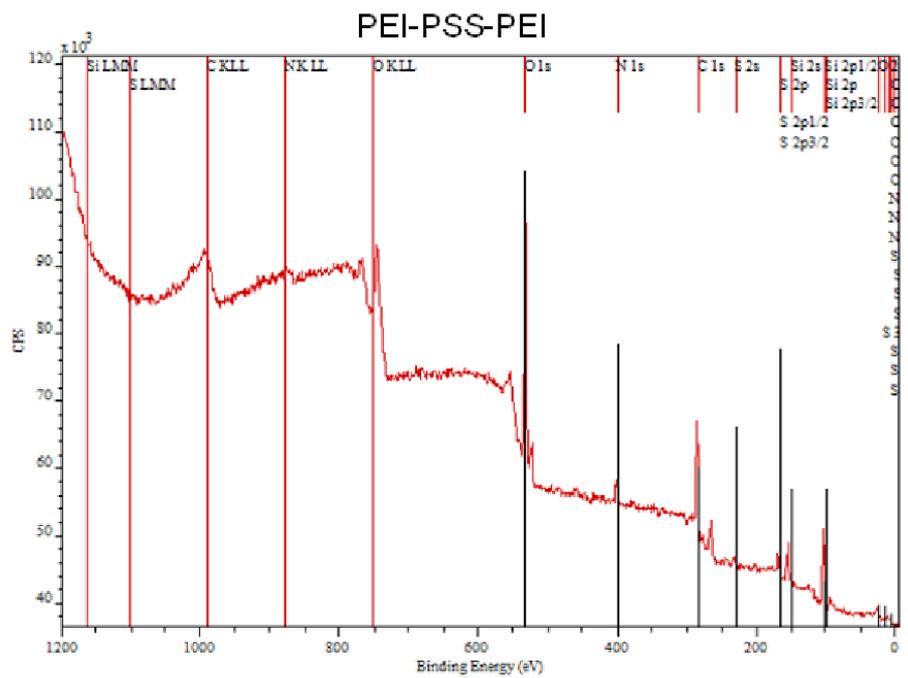


Figura15: Spettri XPS dei multistrati di PEI e PSS.

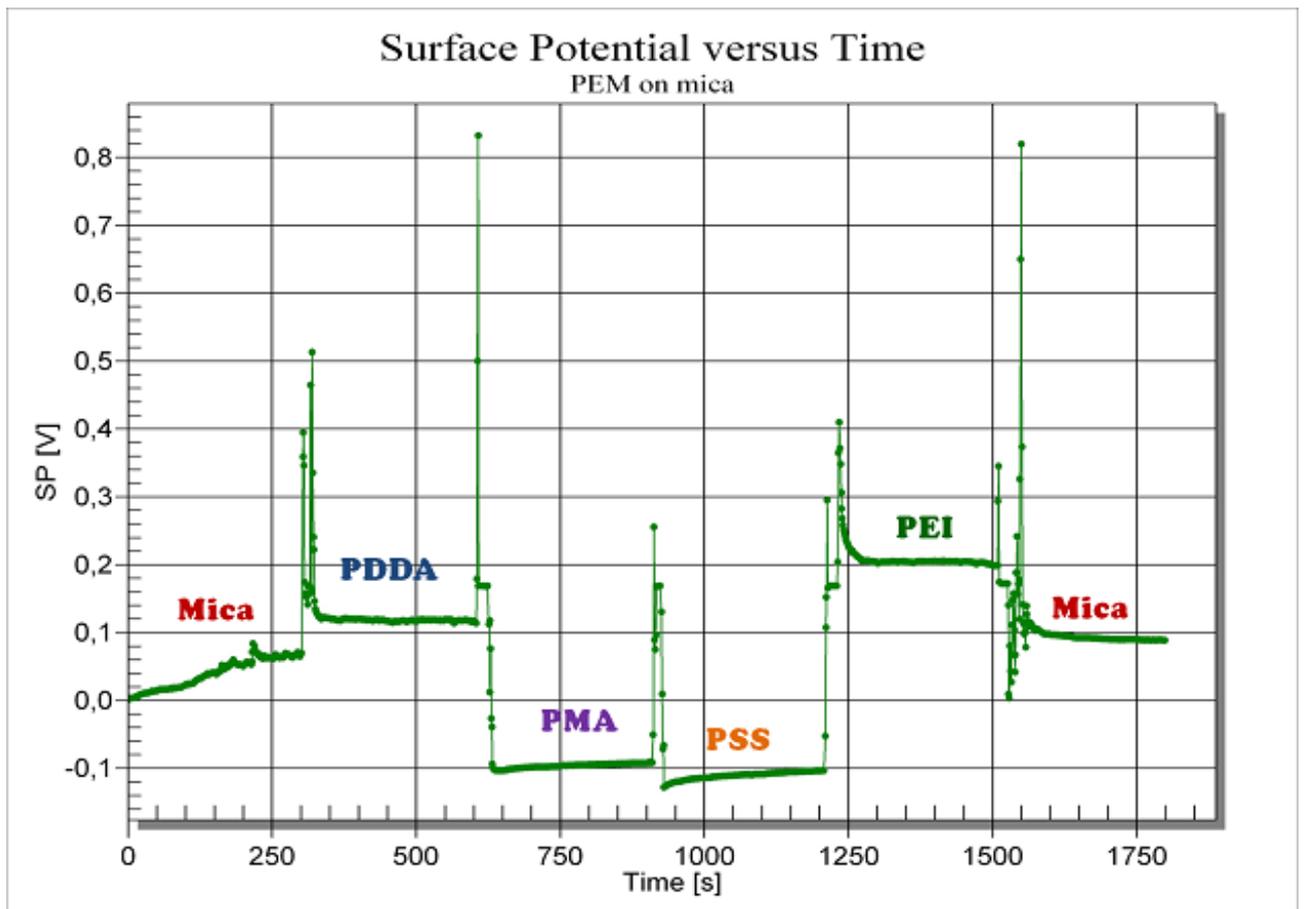


Figura 16: Potenziale delle superfici rivestite con i diversi polielettroliti.

Determinazione indiretta della matrice pericellulare

Le diverse linee cellulari, prima di essere utilizzate per lo studio dei substrati, sono state caratterizzate per la presenza della matrice pericellulare.

Per questo primo screening è stato utilizzato un saggio indiretto, il *particle exclusion assay*, che consente, utilizzando eritrociti fissati come particelle e osservando i preparati con microscopia a contrasto di fase, di mettere in evidenza lo strato di matrice pericellulare che circonda le cellule.⁹²

Dopo 24 dalla semina solo le *MG63* hanno mostrato un'abbondante matrice pericellulare evidenziata come area chiara compresa tra la membrana cellulare e le particelle (Figura 17a). Intorno alle *U2 OS* e alle *Saos-2* si poteva invece osservare un strato di matrice abbastanza esiguo (Figura 17b e d). Dopo trattamento con ialuronidasi, le particelle si portavano a stretto contatto con il bordo cellulare, confermando che l'area di esclusione delle particelle era dovuta

alla presenza della matrice pericellulare (Figura 17b). Sulla base di questi risultati le MG63, che presentavano un abbondante matrice pericellulare, sono state scelte per lo studio successivo.

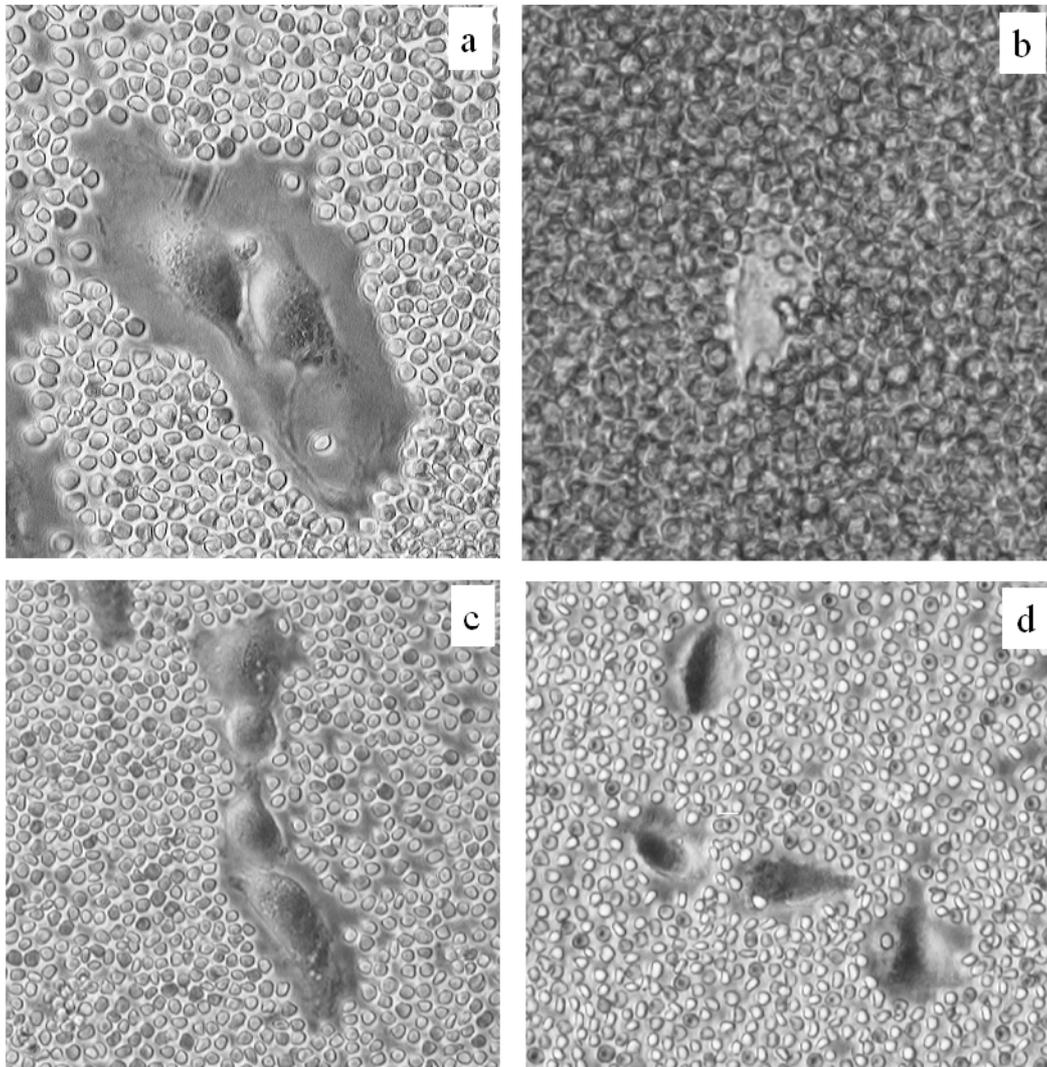


Figura 17: *Particle exclusion assay* per determinare la presenza della matrice pericellulare in a) *MG63*, b) *MG63* trattate con ialuronidasi, c) *U2 OS* e d) *Saos-2*. La matrice pericellulare appare una zona chiara tra il bordo cellulare e gli eritrociti.

Valutazione dell'adesione cellulare sui vari substrati

L'adesione cellulare sui diversi substrati è stata valutata nell'arco di 6 ore. L'osservazione è avvenuta dopo 1 ora dalla semina per valutare il numero di cellule che avevano aderito e la loro morfologia. A 3 ore dalla semina è stata stimata l'organizzazione della matrice pericellulare mediante marcatura dello ialuronano della matrice con proteine specifiche biotinilate (*biotinylated*

Hyaluronic Acid Binding Protein, bHABP); mentre a 6 ore è stata osservata l'organizzazione del citoscheletro e la formazione dei contatti focali.

L'interazione con i substrati formati dai polielettroliti è stata inoltre valutata mediante microscopia *time-lapse*, consentendo una stima temporale del numero di cellule che aderivano al substrato.

Permanox®

Le cellule seminate su Permanox® (plastica per coltura cellulare), dopo 1 ora erano in parte adese e presentavano una morfologia sferico-poligonale. Il trattamento delle cellule con ialuronidasi, per rimuovere la matrice pericellulare, ha ridotto notevolmente il numero di cellule adese che presentavano morfologia decisamente sferica (figura 18).

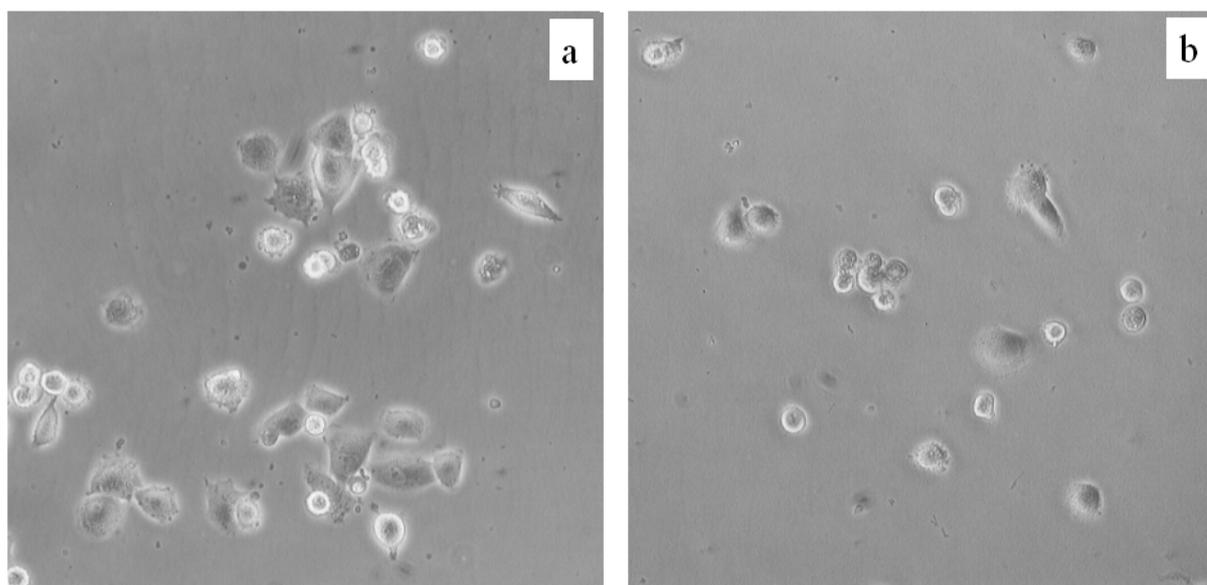


Figura 18: *MG63* seminate su Permanox® dopo 1 ora. a) cellule non trattate, b) cellule trattate con ialuronidasi. (immagine rappresentativa, 20x)

La matrice pericellulare è stata osservata dopo 3 ore dalla semina: tutte le cellule erano adese anche se presentavano una morfologia sferico-poligonale. Attorno alla maggior parte delle cellule era presente uno strato omogeneo di matrice pericellulare, che risultava particolarmente abbondante nelle cellule con una morfologia sferica (Figura 19); la specificità della marcatura è stata confermata dal trattamento con ialuronidasi.

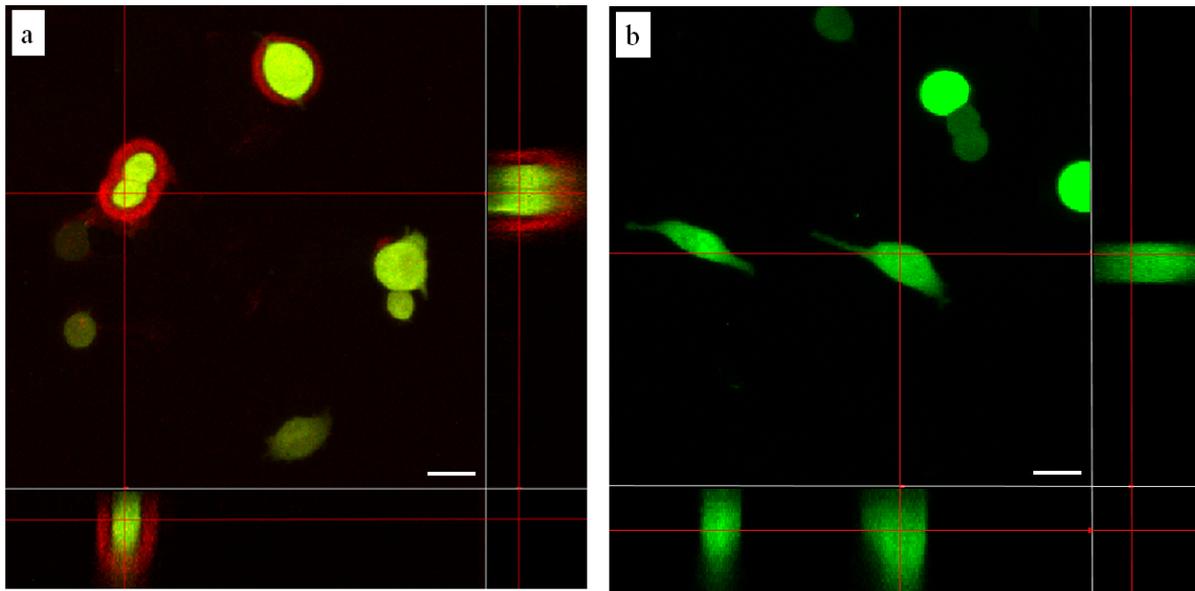


Figura 19: Analisi al microscopio confocale della distribuzione della matrice pericellulare a 3 ore. *MG63* positive per la GFP (verde) seminate su Permanox® . e incubate con bHABP per marcare la matrice pericellulare (rossa). a) cellule non trattate b) cellule trattate con ialuronidasi dopo la marcatura. (sezione xy; barra = 20 μ m, immagine rappresentativa, 60x).

È stata infine determinata l'organizzazione del citoscheletro e dei contatti focali, e quindi di molecole specifiche come actina, vinculina, paxillina e integrina β 1, in presenza o assenza di matrice pericellulare.

Dopo 6 ore le cellule non trattate erano distese e molte erano allungate, con actina citoscheletrica organizzata in fibre. Le adesioni focali non erano evidenti e l'integrina β 1 era visibile solo nel citoplasma, ma assente alla periferia cellulare, quindi nella forma non matura, inattiva (figura 20a-a'). Anche la paxillina presentava una marcatura esclusivamente citoplasmatica (figura 21a-a'), mentre la vinculina su alcune cellule era presente in forma organizzata, anche se non abbondante, alla periferia cellulare (figura 22a-a'). Questo indica la presenza di complessi focali tardivi, che però non maturano poi in adesioni focali.

Le cellule private della matrice pericellulare in seguito a trattamento con ialuronidasi risultavano in numero minore rispetto alle cellule non trattate

(controllo); inoltre la morfologia era alterata con numerose cellule sferiche. L'actina non era organizzata in fibre e si localizzava principalmente alla periferia della cellula. Non si sono invece osservate differenze per quanto riguarda l'espressione delle molecole di adesione rispetto alla cellule non trattate (Figura 20 b- b', 21 b-b', 22 b-b').

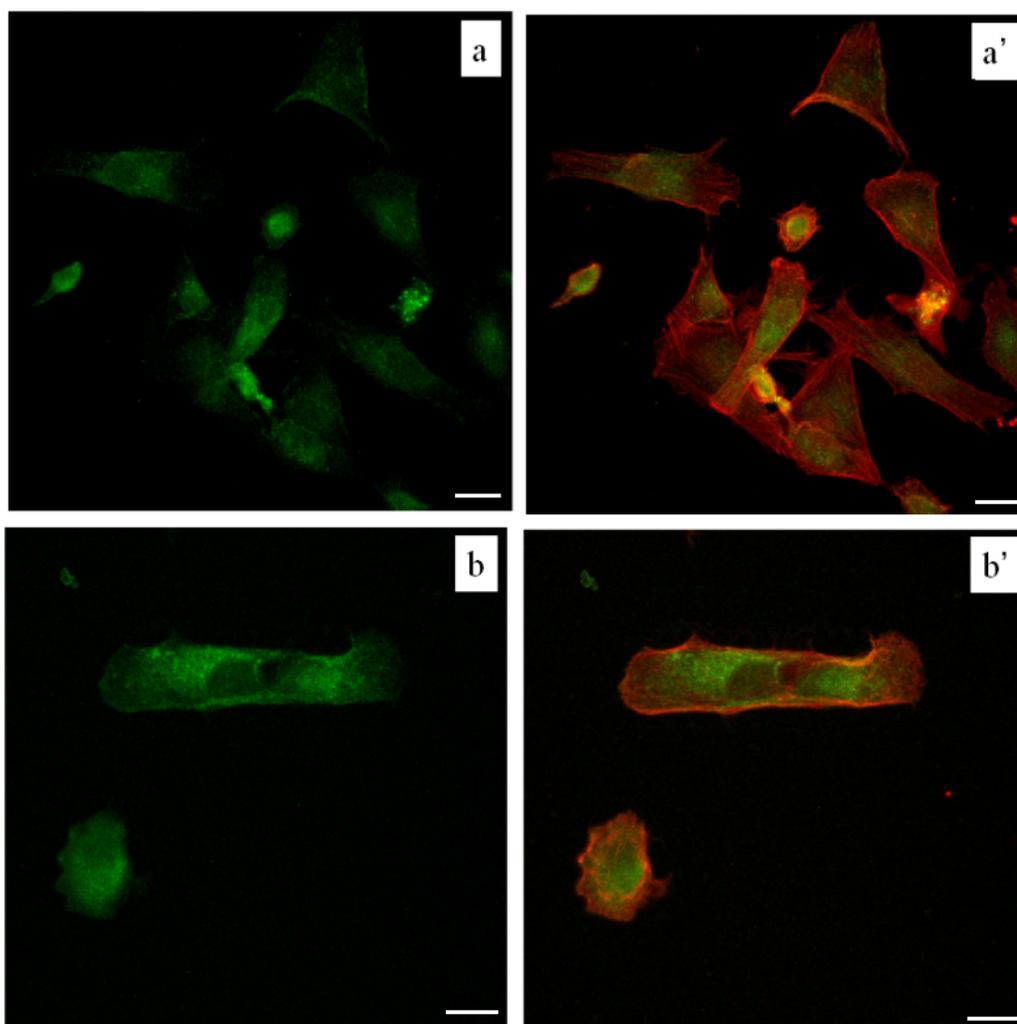


Figura 20: Espressione della **integrina $\beta 1$** in MG63 seminate su Permanox® a 6 ore. a-a') cellule non trattate. b-b') cellule trattate con ialuronidasi. **a, b.** integrina, **a', b'.** integrina in verde e actina in rosso (barra = 20 μm , immagini rappresentative, 60x)

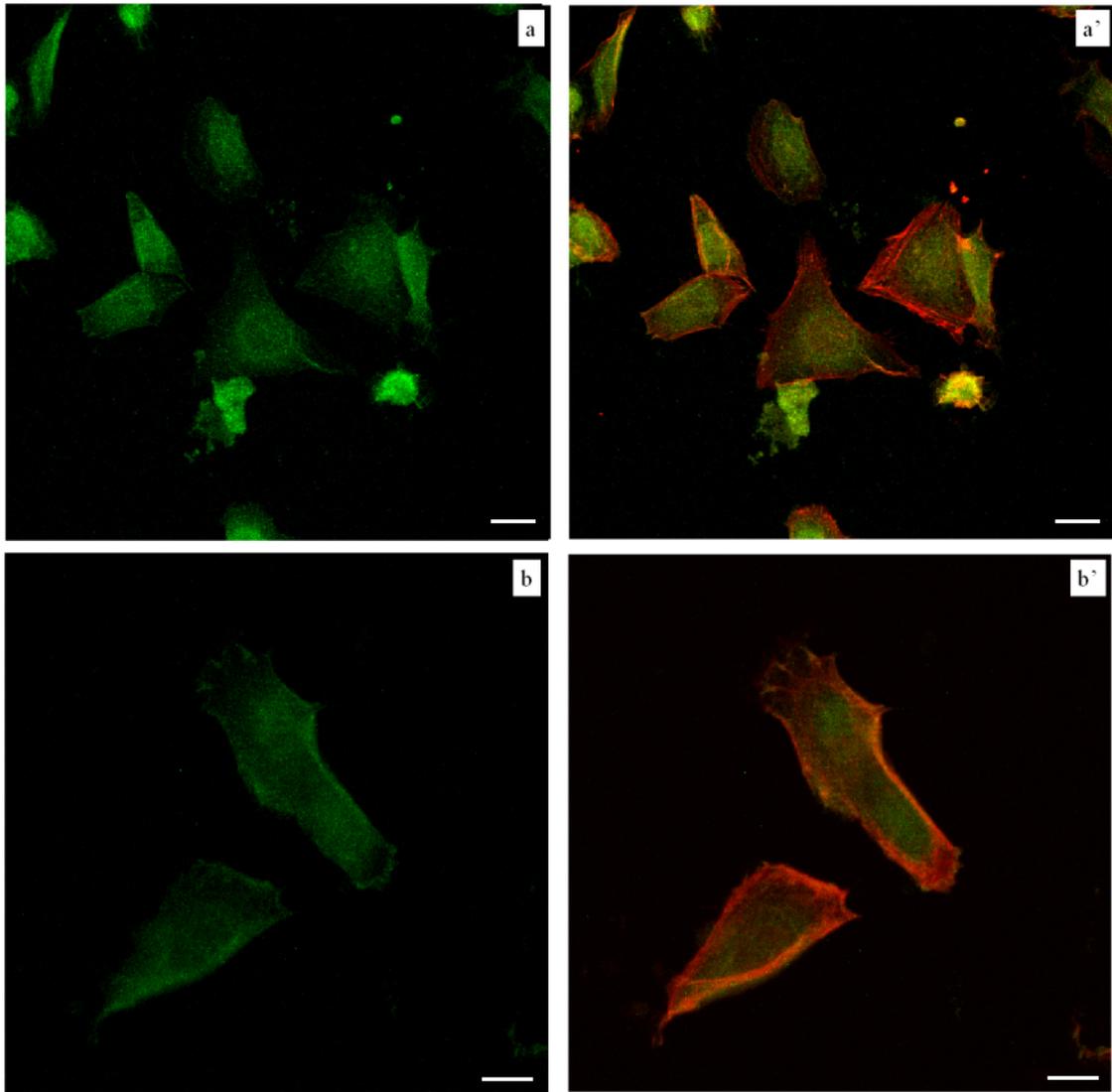


Figura 21: Espressione della **paxillina** in MG63 seminate su Permanox® a 6 ore. a-a') cellule non trattate. b-b') cellule trattate con ialuronidasi. **a, b.** paxillina, **a', b'.** paxillina in verde e actina in rosso (barra = 20 μ m, immagini rappresentative, 60x.).

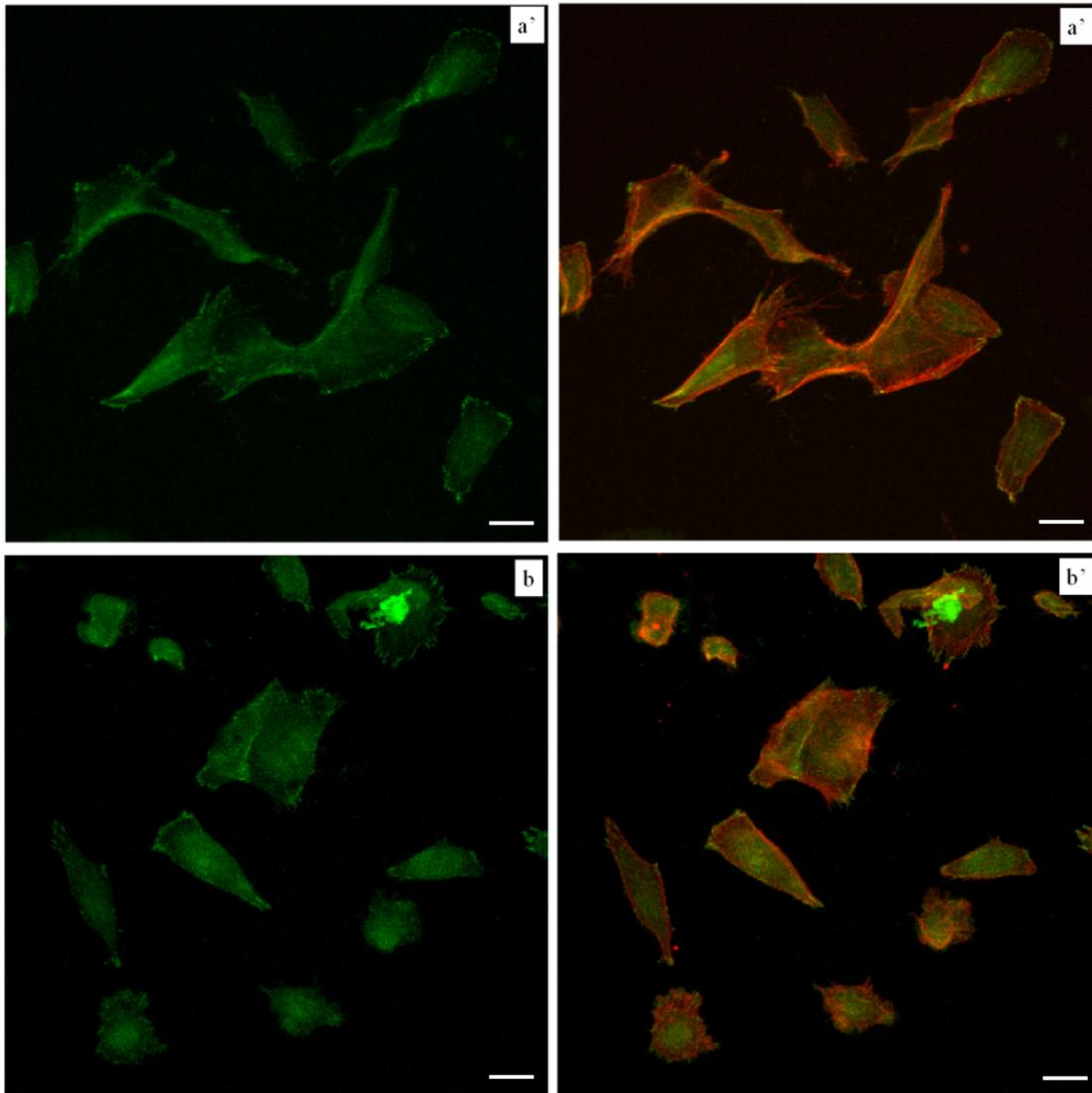


Figura 22: Espressione della **vinculina** in MG63 seminate su Permanox® a 6 ore. a-a') cellule non trattate. b-b') cellule trattate con ialuronidasi. **a, b.** vinculina, visibile in forma organizzata alla periferia cellulare **a', b'.** vinculina in verde e actina in rosso (barra = 20 μ m, immagini rappresentative, 60x).

Fibronectina

L'adesione delle cellule alla fibronectina avviene molto rapidamente: infatti già dopo un'ora, la maggior parte delle cellule era adesa e mostrava una morfologia normale, e numerose cellule iniziavano il processo di distensione. Quando le cellule venivano trattate con ialuronidasi non erano evidenti particolari differenze rispetto alle cellule di controllo (Figura 23).

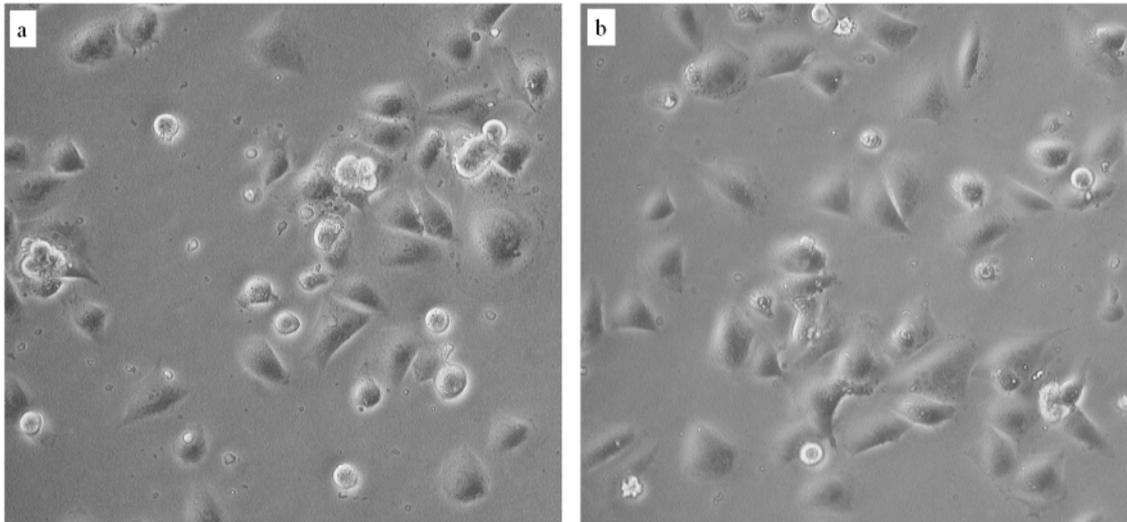


Figura 23: *MG63* seminate su **fibronectina** a un'ora. a) cellule non trattate, b) cellule trattate con ialuronidasi. (immagine rappresentativa, 20x)

Dopo 3 ore le cellule erano tutte adese e ben distese. La matrice pericellulare era presente attorno ad alcune cellule in maniera incompleta e irregolare, con marcatura visibile anche sul substrato (Figura 24).

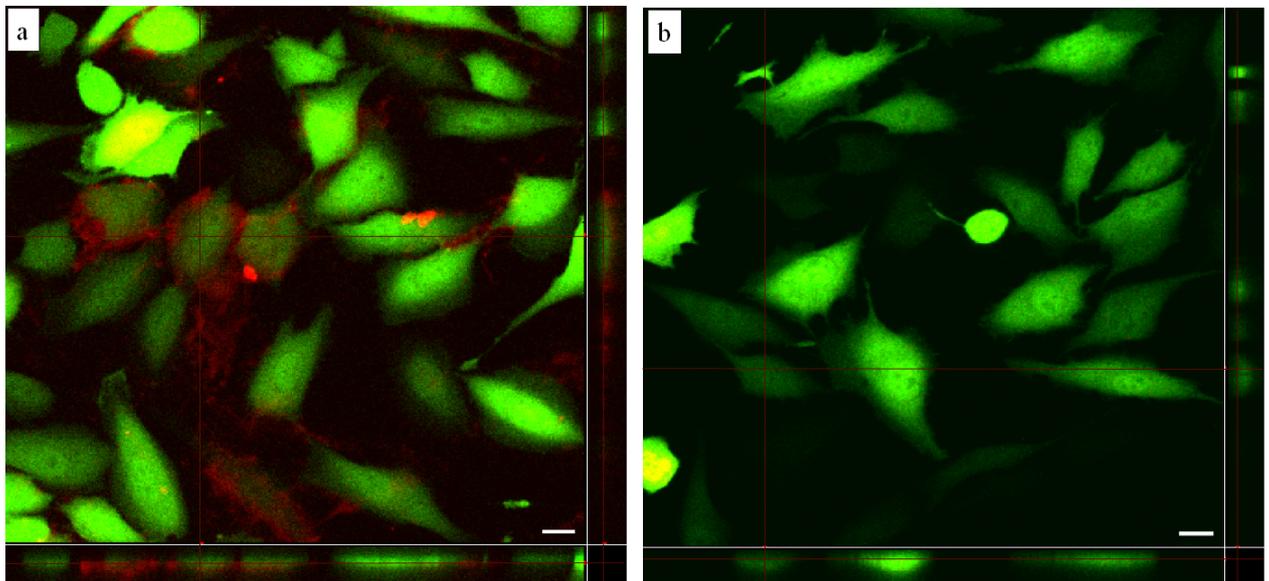


Figura 24: Analisi al microscopio confocale della distribuzione della matrice pericellulare. *MG63* positive per la GFP (verde) seminate su **fibronectina** a 3 ore e incubate con bHABP per marcare la matrice pericellulare (rossa). a) cellule non trattate,

b) cellule trattate con ialuronidasi dopo la marcatura. (sezione xy; barra = 20 μm , immagine rappresentativa, 60x).

Sulla fibronectina, dopo 6 ore, sia le cellule non trattate che quelle incubate con ialuronidasi erano ben adese, di forma poligonale o allungata, con citoscheletro ben organizzato in *stress fibers*, principalmente di tipo ventrale, e un'intensa espressione di tutte le molecole di adesione, che si organizzavano a formare adesioni focali e fibrillari. L'integrina $\beta 1$ era ben evidente sia alla superficie cellulare nelle regioni periferiche, dove mostrava la marcatura tipica dell'integrina matura nei contatti focali, sia nel citoplasma, dove era presente una marcatura puntiforme che riflette il pool di proteina non matura (figura 25a-a'). La marcatura della paxillina era principalmente localizzata ai bordi cellulari, dove la proteina si connette con le *stress fibers* (figura 26a-a'); La vinculina infine era presente sia ai bordi che verso il centro della cellula, in forma matura e allungata (figura 27a-a').

Quando le cellule erano trattate con ialuronidasi, per l'integrina $\beta 1$ è stato osservato un aumento della fluorescenza nella regione citoplasmatica, accompagnata da una leggera riduzione della marcatura alla periferia della cellula (figura 25b-b'). Questo indica una ridotta traslocazione della proteina alla superficie cellulare, che rimane nel reticolo endoplasmatico in forma immatura. L'eliminazione della matrice pericellulare non aveva invece effetti sull'espressione e distribuzione della paxillina e della vinculina (figure 26b-b', 27b-b').

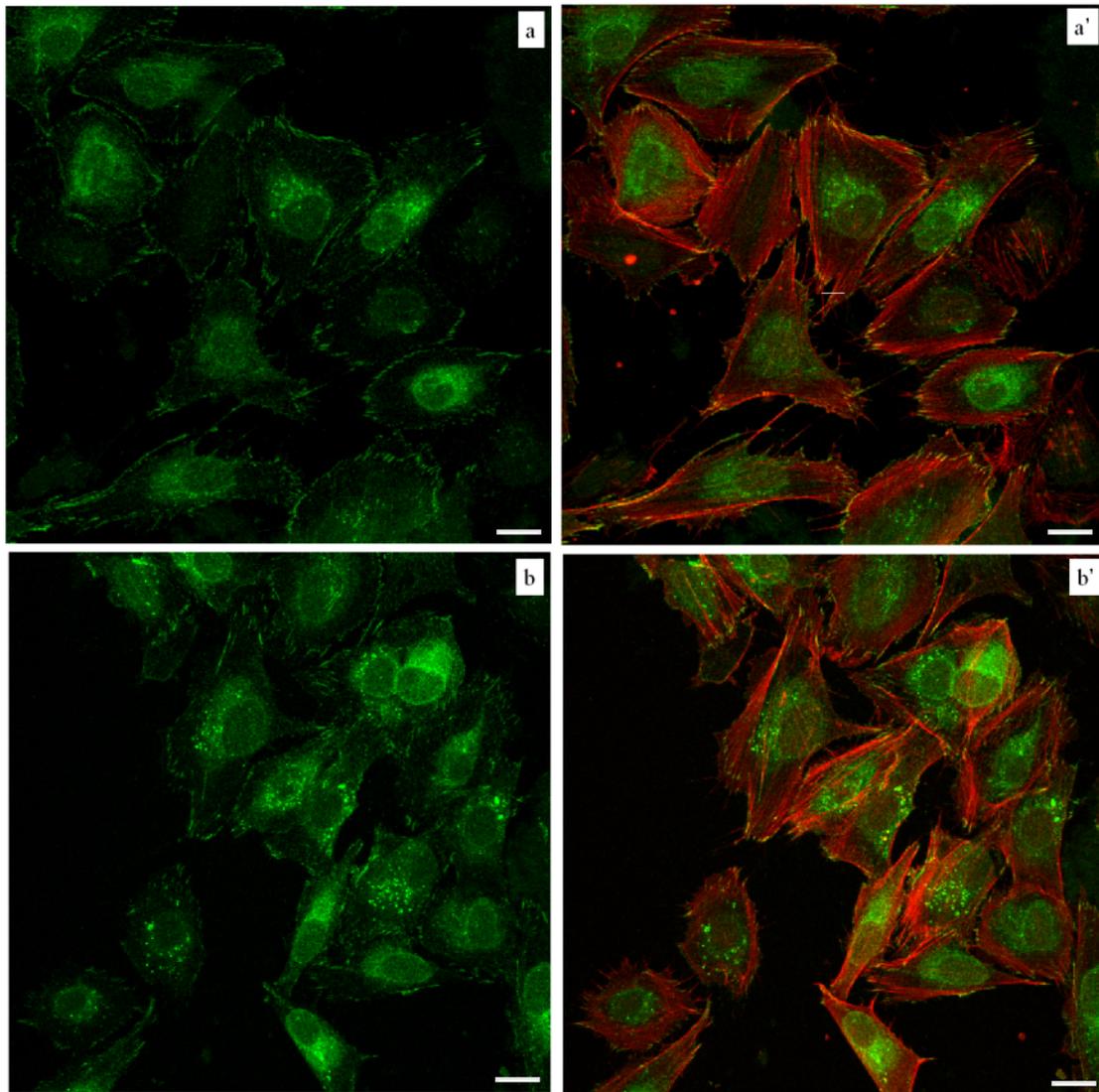


Figura 25: Espressione della **integrina $\beta 1$** in MG63 seminate su **fibronectina** a 6 ore. a-a') cellule non trattate. b-b') cellule trattate con ialuronidasi. **a, b.** integrina, **a', b'.** integrina in verde e actina in rosso (barra = 20 μm , immagini rappresentative, 60x)

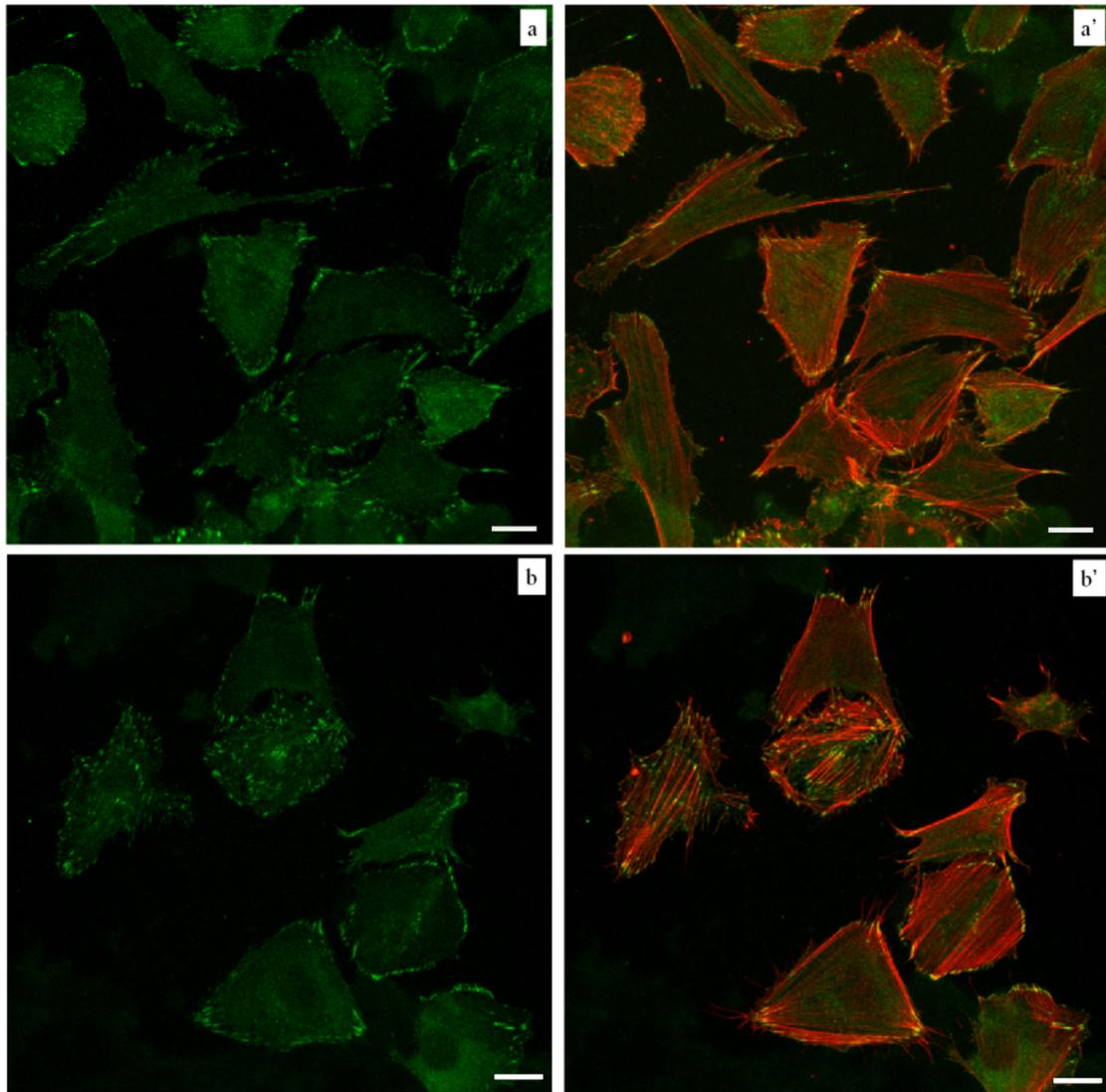


Figura 26: Espressione della **paxillina** in MG63 seminate su **fibronectina** a 6 ore. a-a') cellule non trattate. b-b') cellule trattate con ialuronidasi. **a, b.** paxillina, **a', b'.** paxillina in verde e actina in rosso (barra = 20 μ m, immagini rappresentative, 60x).

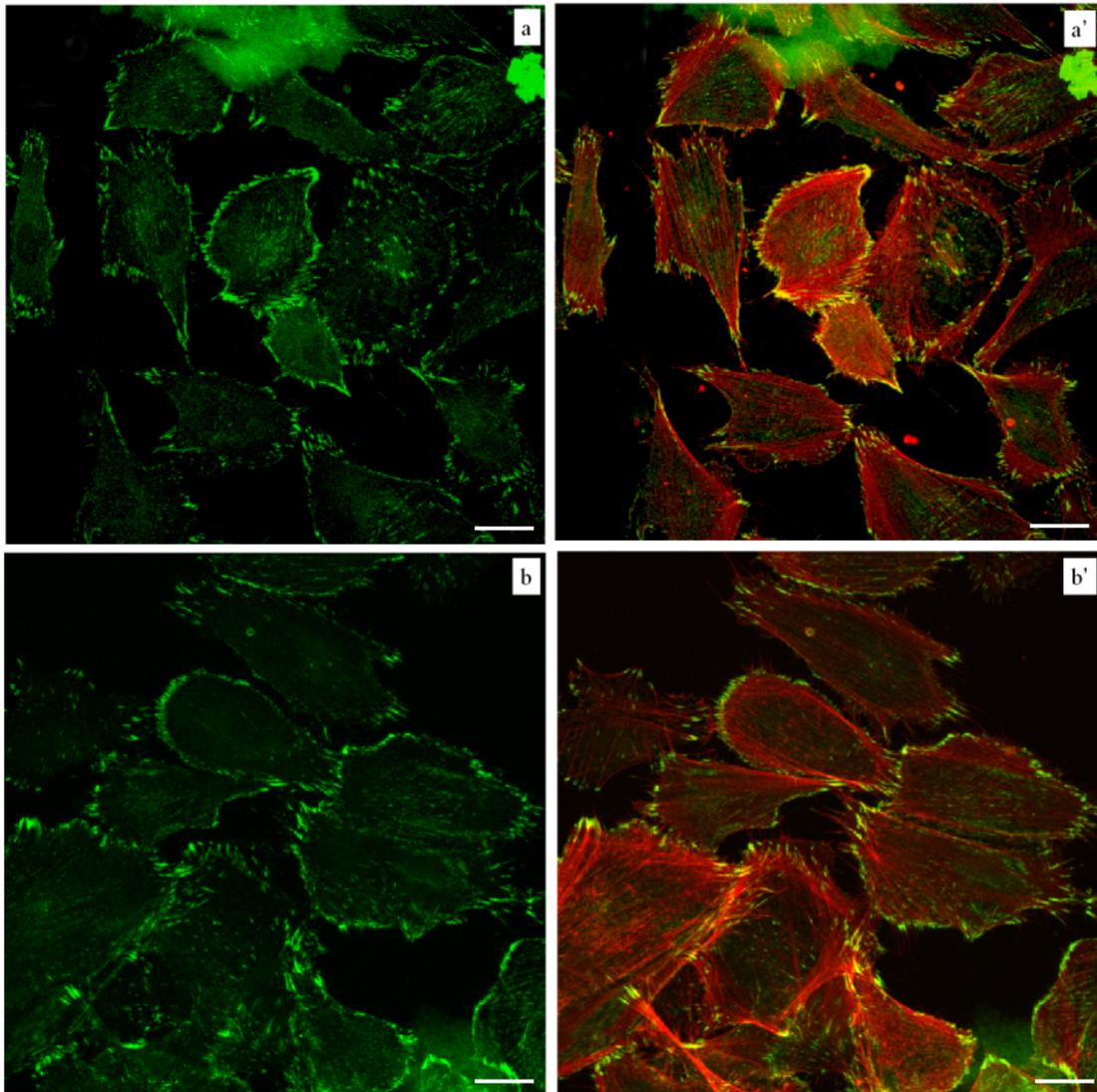


Figura 27: Espressione della **vinculina** in MG63 seminate su **fibronectina** a 6 ore. a-a') cellule non trattate. b-b') cellule trattate con ialuronidasi. **a, b.** vinculina, visibile in forma organizzata alla periferia cellulare **a', b'.** vinculina in verde e actina in rosso (barra = 20 μm , immagini rappresentative, 60x).

Collagene I

Le cellule seminate sul collagene aderiscono più lentamente rispetto alla fibronectina. Dopo un'ora comunque molte cellule erano adese e mostravano diversi gradi di distensione, con cellule allungate, poligonali e sferiche. Nel campione di cellule trattato con ialuronidasi c'erano invece meno cellule adese, che presentavano tendenzialmente una morfologia sferica (Figura 28).

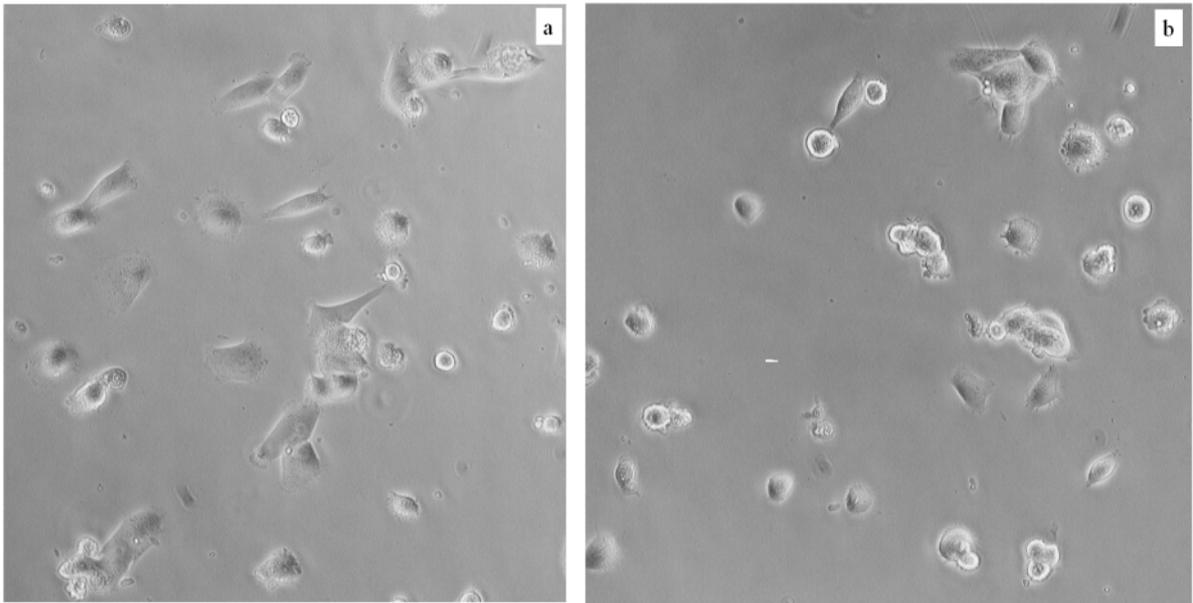


Figura 28: *MG63* seminate su **collagene I** a un'ora. a) cellule non trattate, b) cellule trattate con ialuronidasi. (immagine rappresentativa, 20x)

La matrice pericellulare, valutata dopo 3 ore dalla semina, era presente su tutte le cellule, e appariva abbondante e continua attorno al corpo cellulare di alcune cellule, mentre su altre era localizzata in punti, come le regioni laterali del corpo cellulare. Morfologicamente le cellule non trattate apparivano poligonali, con formazione di filopodi, mentre quando la matrice veniva rimossa alcune cellule presentavano una morfologia sferica (Figura 29).

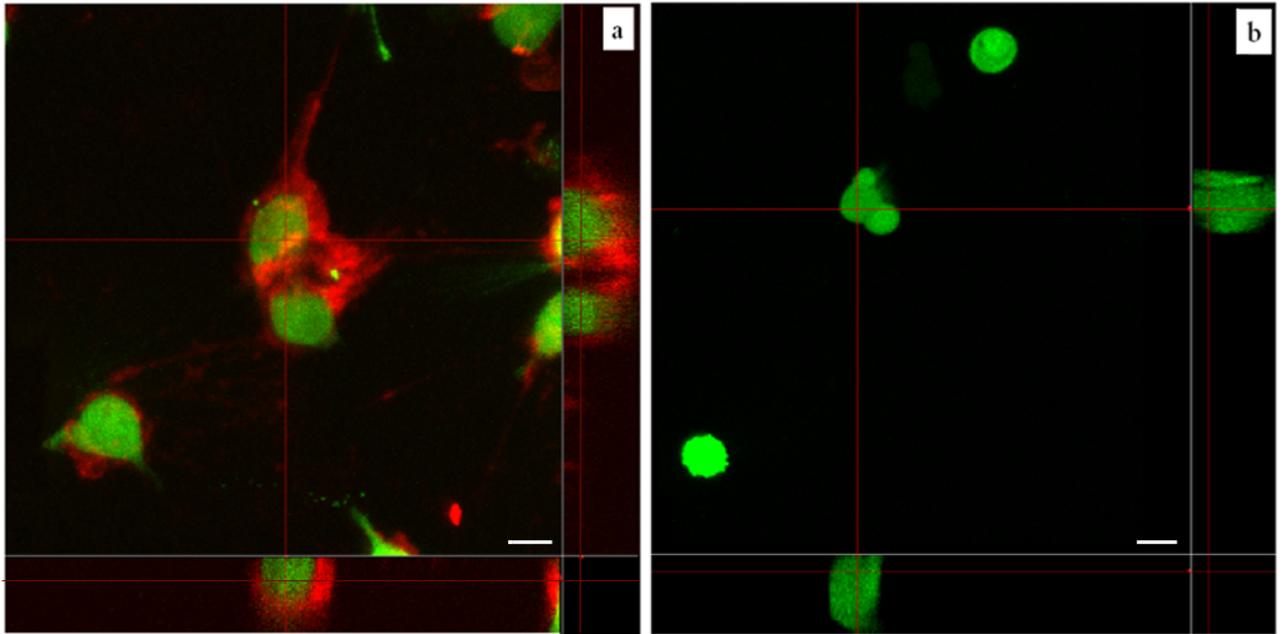


Figura 29: Analisi confocale della distribuzione della matrice pericellulare. *MG63* positive per la GFP (verde) seminate su **collagene I** a 3 ore e incubate con bHABP per marcare la matrice pericellulare (rossa). a) cellule non trattate, b) cellule trattate con ialuronidasi dopo la marcatura. (sezione xy; barra = 20 μm , immagine rappresentativa, 60x).

Le cellule non trattate, dopo 6 ore, presentavano morfologia normale e citoscheletro organizzato, evidenziando anche la presenza di filopodi e *stress fibers*. Nelle cellule prive di matrice l'actina era ancora organizzata, ma non si formavano *stress fibers* (Figure 30, 31 e 32). L'integrina $\beta 1$ non era organizzata nei contatti focali, ma si evidenziava solo nella forma inattiva nel citoplasma. Le cellule trattate con l'enzima non presentavano differenze per quanto riguarda questa proteina (Figura 30). La paxillina era intensamente marcata alla periferia della cellula, presentando una forma bastoncellare allungata, tipica delle adesioni focali; inoltre, anche verso il centro della cellula era visibile una marcatura a *spots* che indica la formazione di complessi focali. In assenza di matrice si osservava una decisa riduzione delle strutture bastoncellari e la scomparsa degli *spots* nella porzione centrale (Figura 31).

Infine, tra le due condizioni non sono state osservate differenze per quanto riguarda la marcatura della vinculina, che rimane evidente alle estremità delle cellule (Figura 32).

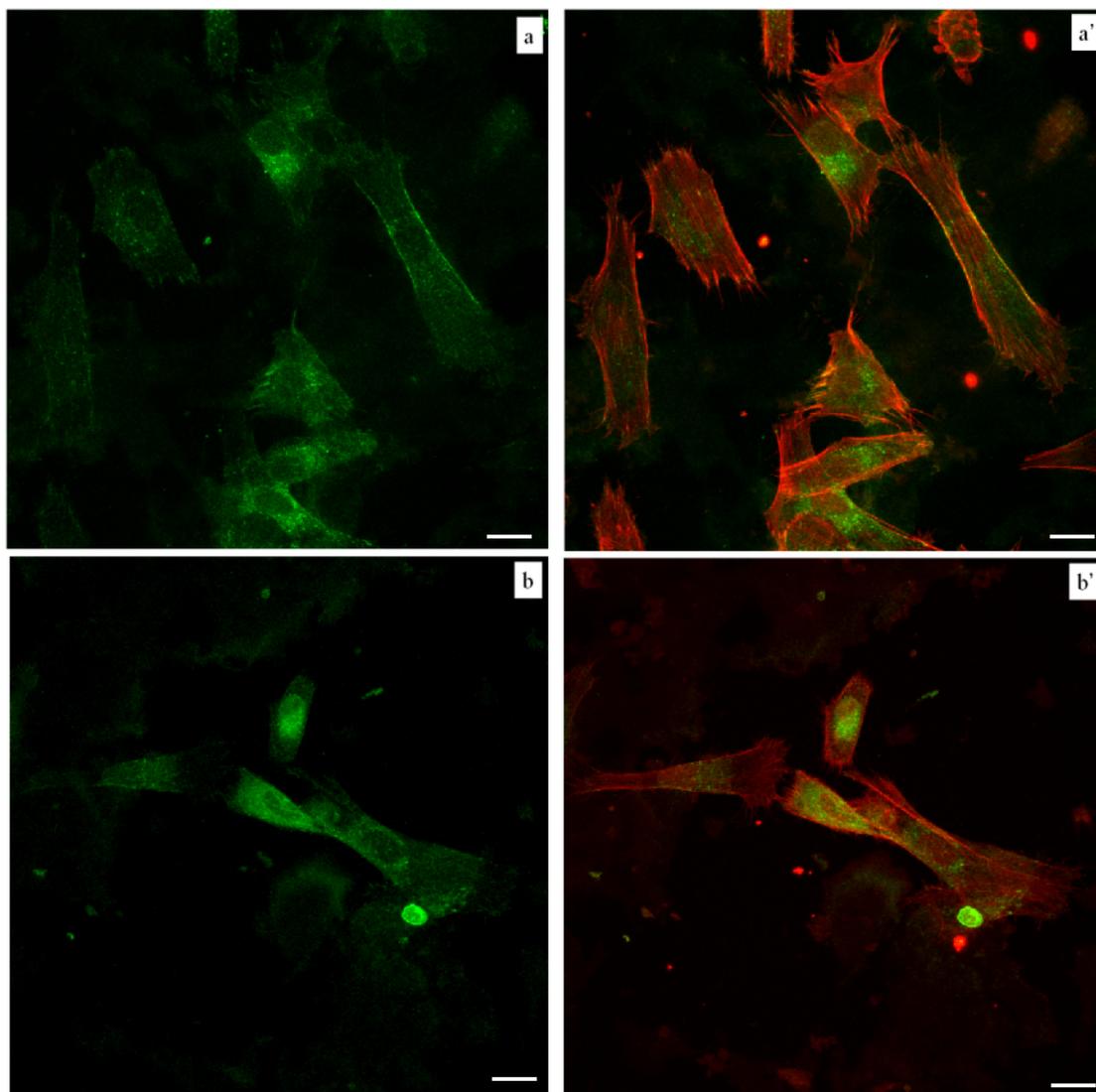


Figura 30: Espressione della **integrina $\beta 1$** in MG63 seminate su **fibronectina** a 6 ore. a-a') cellule non trattate. b-b') cellule trattate con ialuronidasi. **a, b.** integrina, **a', b'.** integrina in verde e actina in rosso (barra = 20 μm , immagini rappresentative, 60x).

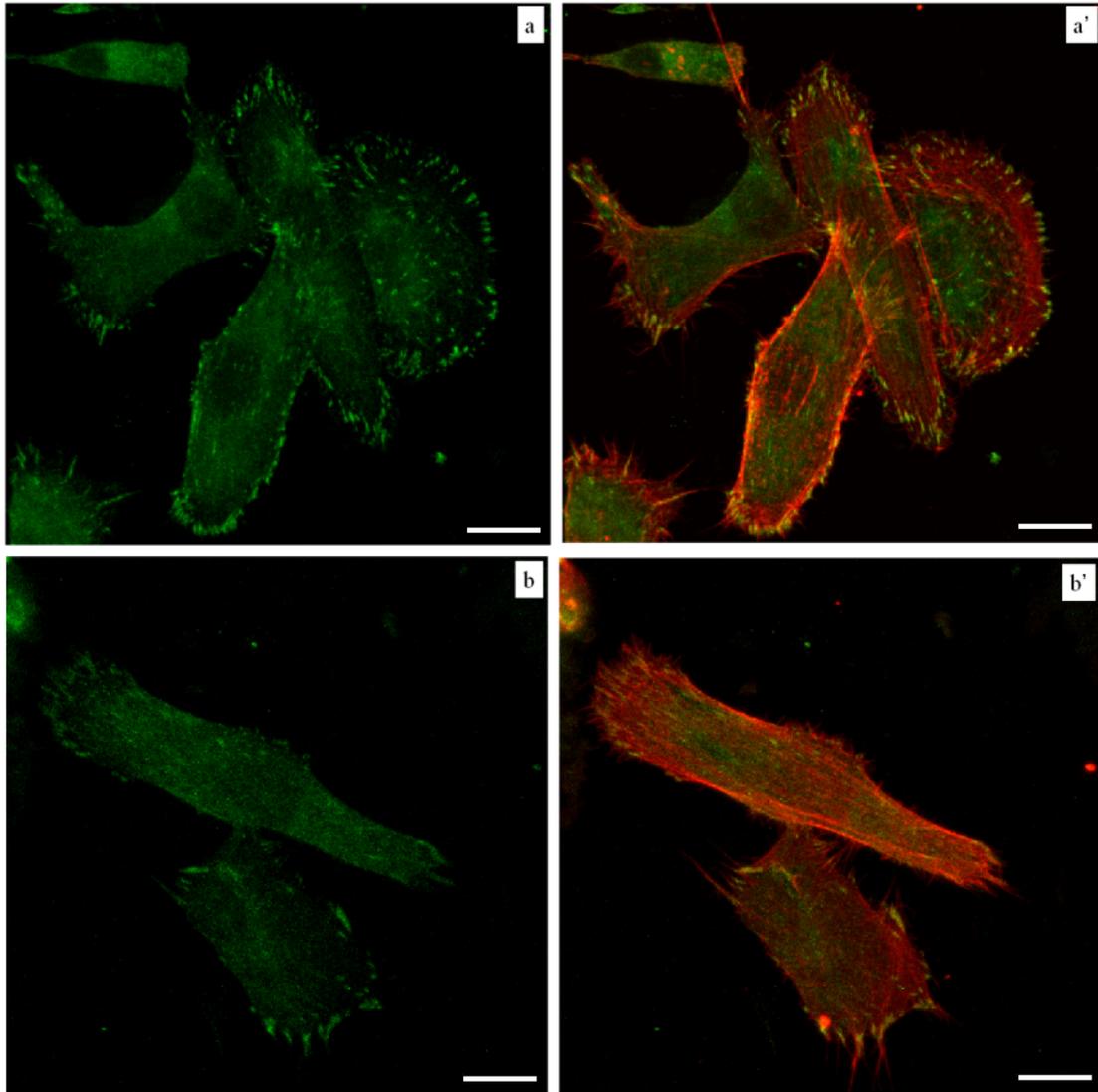


Figura 31: Espressione della **paxillina** in MG63 seminate su **collagene** a 6 ore. a-a') cellule non trattate. b-b') cellule trattate con ialuronidasi. **a, b.** paxillina, **a', b'.** paxillina in verde e actina in rosso (barra = 20 μ m, immagini rappresentative, 60x).

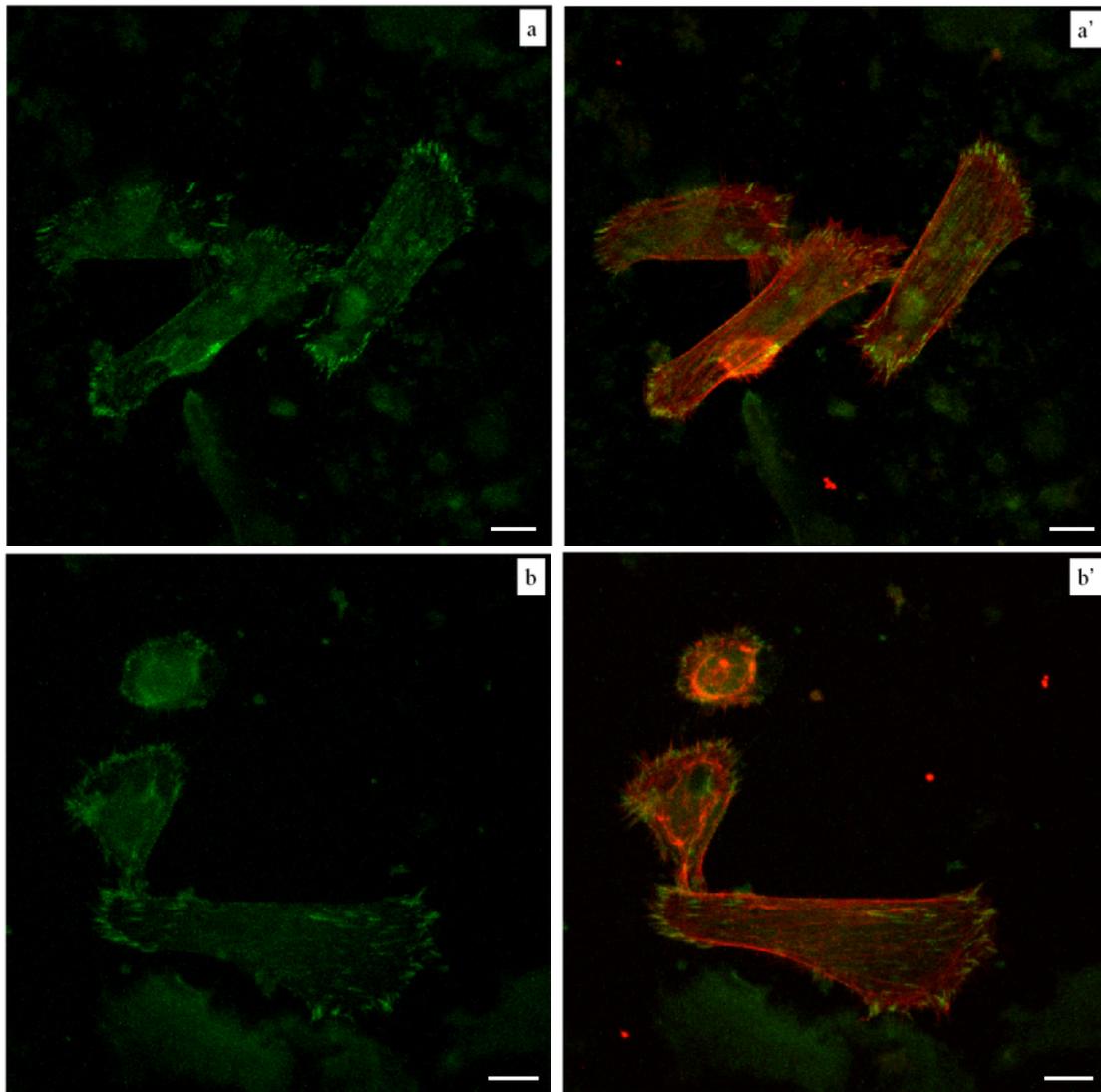


Figura 32: Espressione della **vinculina** in MG63 seminate su **collagene** a 6 ore. a-a') cellule non trattate. b-b') cellule trattate con ialuronidasi. **a, b.** vinculina, visibile in forma organizzata alla periferia cellulare **a', b'**. vinculina in verde e actina in rosso (barra = 20 μ m, immagini rappresentative, 60x).

Polietilenimmina (PEI)

L'interazione cellula-substrato è stata determinata mediante microscopia *time lapse*, che ha consentito di valutare l'evoluzione di questo processo a tempi ravvicinati, per un lasso di tempo di 5 ore. Le MG63 messe a contatto con la PEI aderivano scarsamente: dopo un'ora infatti solo il 10% delle cellule erano adese e presentavano una morfologia sferica. Circa il 30% di cellule aderiva a 3 ore dalla semina, per raggiungere il 50% alle 5 ore (figura 33). Una volta adese, le cellule

mantenevano una forma sferica, con il bordo cellulare appiattito e ricco di estroflessioni. Quando le cellule venivano trattate con ialuronidasi, l'adesione iniziale era paragonabile a quella delle cellule non trattate, ma ai tempi successivi poche cellule aderivano in queste condizioni, raggiungendo dopo 3 ore una percentuale di adesione solo del 14%. Tale differenza, rispetto alle cellule non trattate, diventava significativa ai tempi successivi, dove la percentuale di adesione era pari al 18 e 21% a 4 e 5 ore rispettivamente (figura 33).

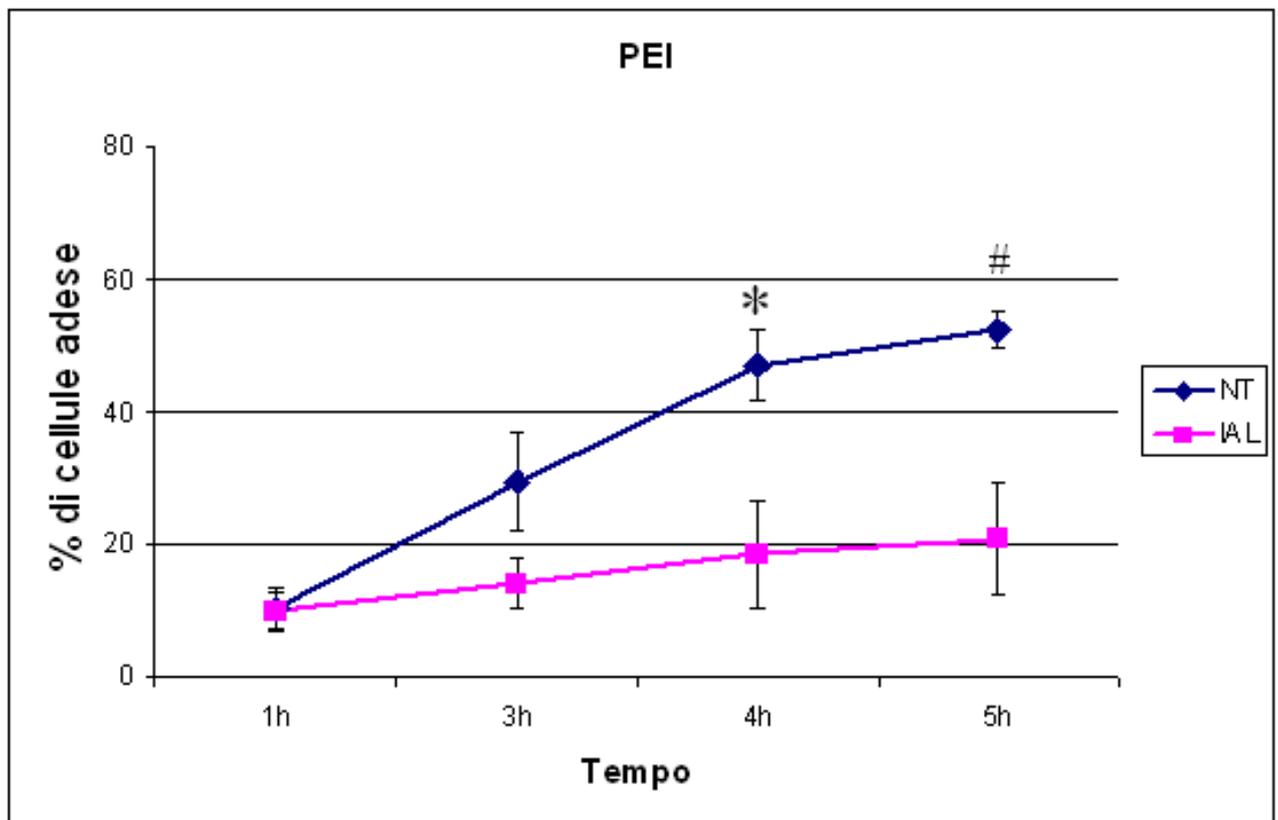


Figura 33: Percentuale di cellule adese su PEI sul numero totale di cellule seminate. **NT.** cellule non trattate, **IAL.** cellule trattate con ialuronidasi (* $p=0,0283$ NT vs IAL a 3 h; # $p=0,0163$ NT vs IAL a 4 h, calcolata con Mann-Whitney test).

La matrice pericellulare, a 3 ore dalla semina, era presente attorno a tutte le cellule e risultava molto abbondante e continua (Figura 34).

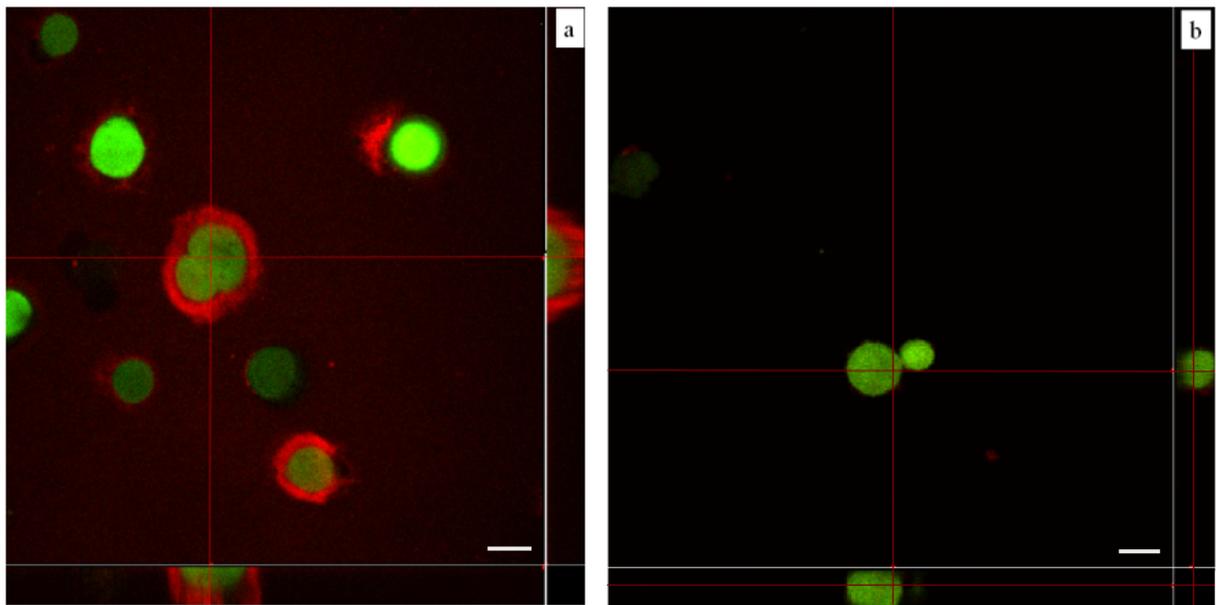


Figura 34: Analisi confocale della distribuzione della matrice pericellulare in vivo. *MG63* positive per la GFP (verde) seminate su **PEI** a 3 ore e incubate con bHABP per marcare la matrice pericellulare (rossa). a) cellule non trattate, b) cellule trattate con ialuronidasi dopo la marcatura. (sezione xy; barra = 20 μm , immagine rappresentativa, 60x).

Per quanto riguarda l'organizzazione del citoscheletro, l'actina al centro della cellula era completamente disorganizzata, mentre alla periferia cellulare e nei filopodi era presente in fibre, ma le *stress fibers* erano assenti. Non erano visibili contatti focali, in quanto tutte le proteine esaminate erano presenti solo nel citoplasma, dove era visibile una marcatura diffusa. La digestione della matrice pericellulare non ha avuto effetto né sull'organizzazione del citoscheletro né sulla formazione dei contatti focali (Figura 35).

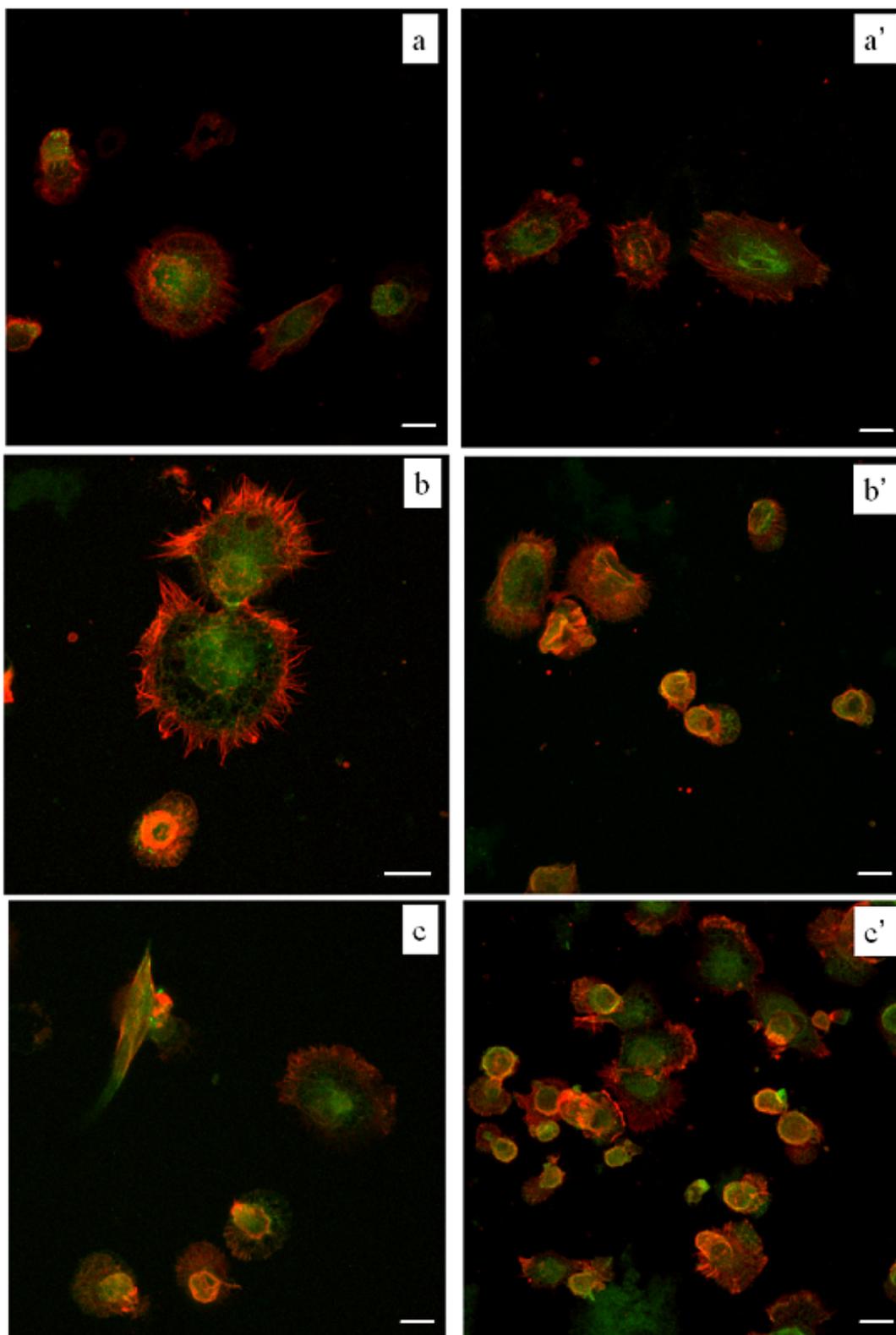


Figura 35: Espressione della **molecole di adesione** in MG63 seminate su PSSa 6 ore. a, b,c) cellule non trattate. a', b', c') cellule trattate con ialuronidasi. Molecole di adesione in verde, actina in rosso. **a-a'**. integrina $\beta 1$; **b-b'**. paxillina; **c-c'**. vinculina (barra = 20 μm , immagini rappresentative, 60x).

Poli(4 stirene-solfonato) (PSS)

Sul PSS le cellule aderivano molto più rapidamente ed in numero maggiore rispetto al PEI, con una percentuale di circa il 65% dopo un'ora dalla semina. Inoltre, a differenza del PEI, su tale substrato le cellule presentavano gradi di distensione diversa, con presenza anche di cellule di forma poligonale. Le cellule senza matrice pericellulare non presentavano alcuna differenza rispetto alle cellule non trattate, sia nel numero di cellule adese che nella morfologia. A tre ore dalla semina, in entrambe le condizioni, la maggior parte delle cellule avevano aderito al substrato presentando una morfologia distesa e allungata; dopo 5 ore la percentuale di adesione era di circa il 95%. Quando le cellule venivano private della matrice non si osservava una riduzione della percentuale di adesione a nessun tempo esaminato (Figura 36).

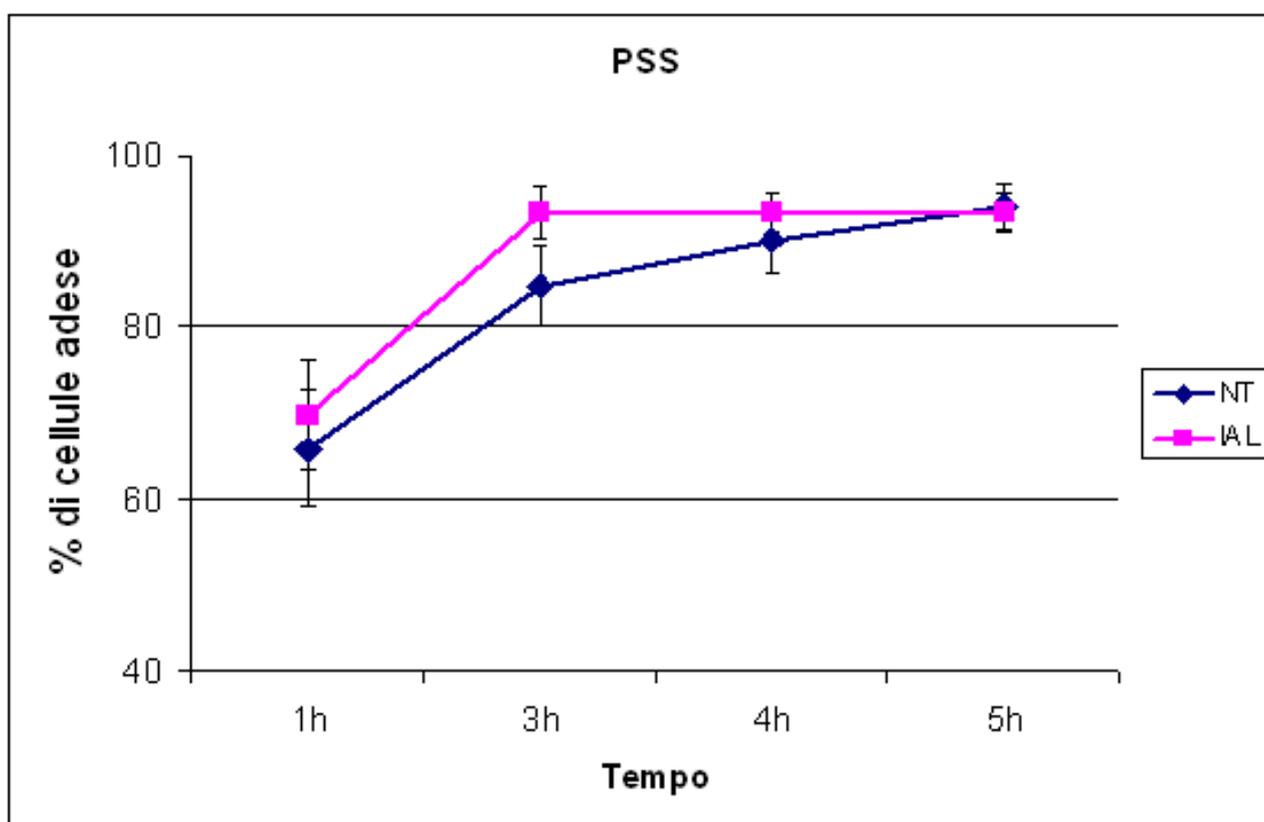


Figura 36: Percentuale di cellule adese sul PSS sul numero totale di cellule seminate NT. cellule non trattate, IAL. cellule trattate con ialuronidasi.

All'osservazione al microscopio confocale la matrice pericellulare, apparentemente poco compatta, non era distribuita in maniera omogenea intorno alle cellule, ma era presente a zone, soprattutto sulle cellule distese, dove si organizzava ai lati del corpo cellulare (figura 37).

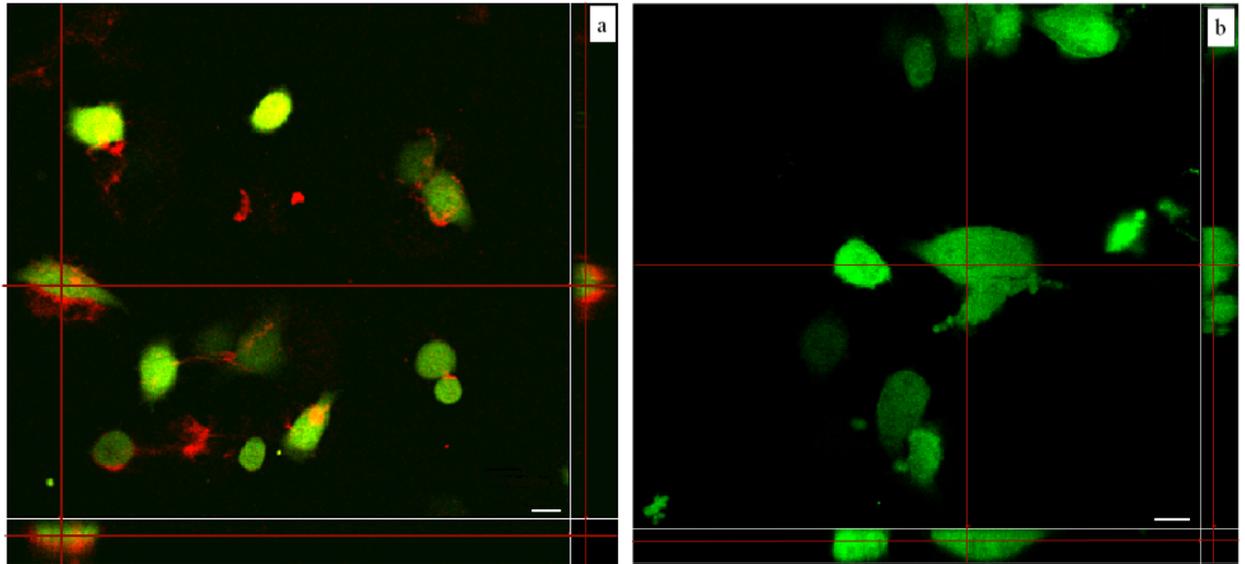


Figura 37: Analisi al microscopio confocale della distribuzione della matrice pericellulare. *MG63* positive per la GFP (verde) seminate su **PSS** a 3 ore e incubate con bHABP per marcare la matrice pericellulare (rossa). a) cellule in condizioni normali, b) cellule trattate con ialuronidasi dopo la marcatura. (sezione xy; barra = 20 μm , immagine rappresentativa, x60).

In presenza di matrice pericellulare le cellule erano distese e il citoscheletro era organizzato in fasci, soprattutto alla periferia cellulare, dove era evidente la presenza di *stress fibers*. L'integrina $\beta 1$ non era organizzata in contatti focali, ma era presente solo nella forma citoplasmatica (Figura 38); sia la paxillina che la vinculina, oltre al pool citoplasmatico, erano invece ben evidenti ai bordi cellulari, organizzate in strutture bastoncellari, a indicare la formazione di adesioni focali (Figure 39-40). Le cellule private della matrice pericellulare presentavano l'actina organizzata in fasci alla periferia cellulare, ma non erano visibili *stress fibers*. L'integrina $\beta 1$ era presente, come nelle cellule non trattate, solo nella forma inattiva, citoplasmatica. In queste cellule la paxillina non si

organizzava in contatti focali, essendo infatti quasi assente alla periferia cellulare, mentre una più intensa fluorescenza era visibile nel citoplasma. La vinculina era visibile ai bordi della cellula in forma organizzata, anche se meno abbondante rispetto alle cellule non trattate.

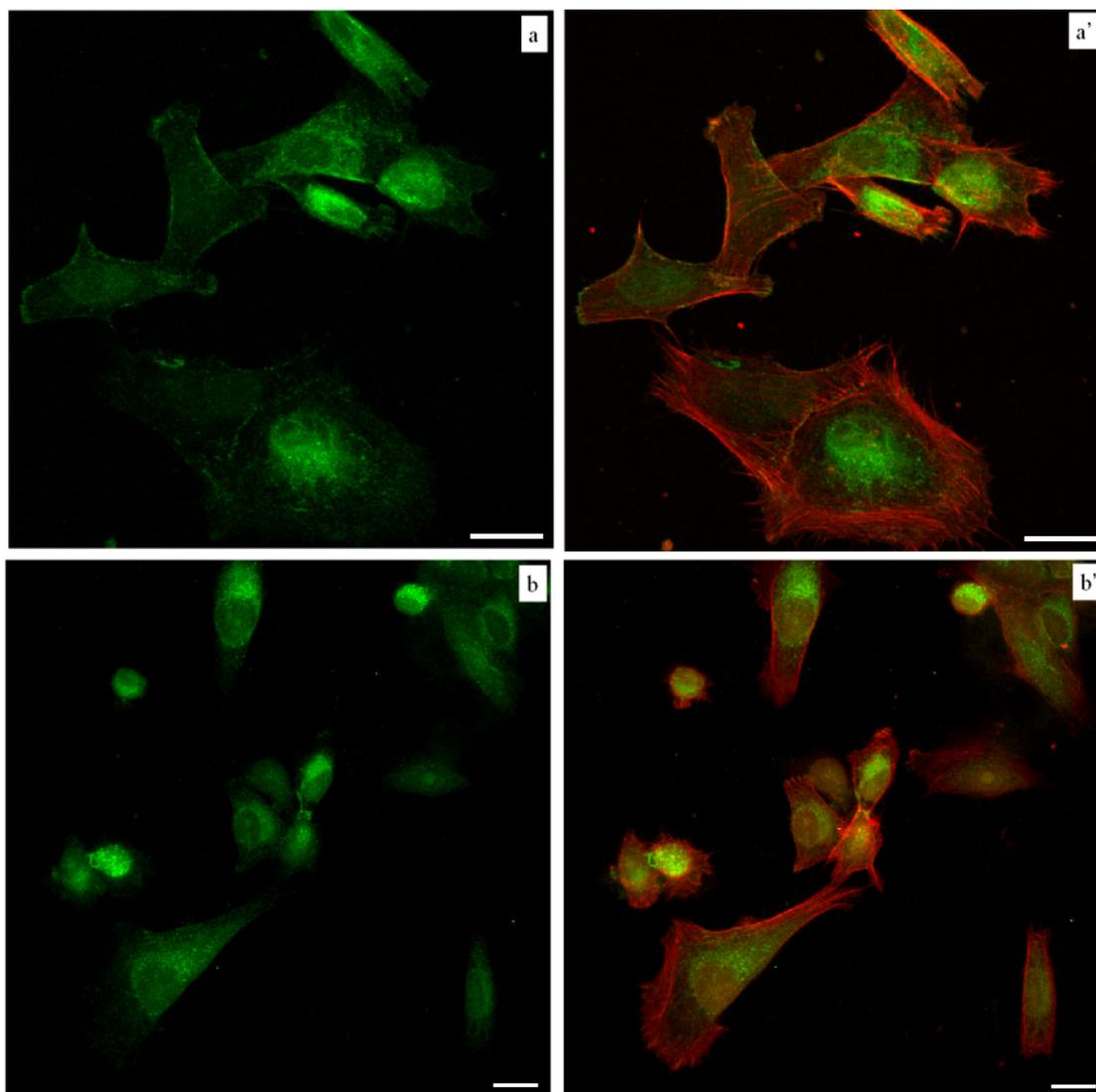


Figura 38: Espressione della **integrina $\beta 1$** in MG63 seminate su PSS a 6 ore. a-a') cellule non trattate. b-b') cellule trattate con ialuronidasi. **a, b.** integrina, **a', b'.** integrina in verde e actina in rosso (barra = 20 μm , immagini rappresentative, 60x).

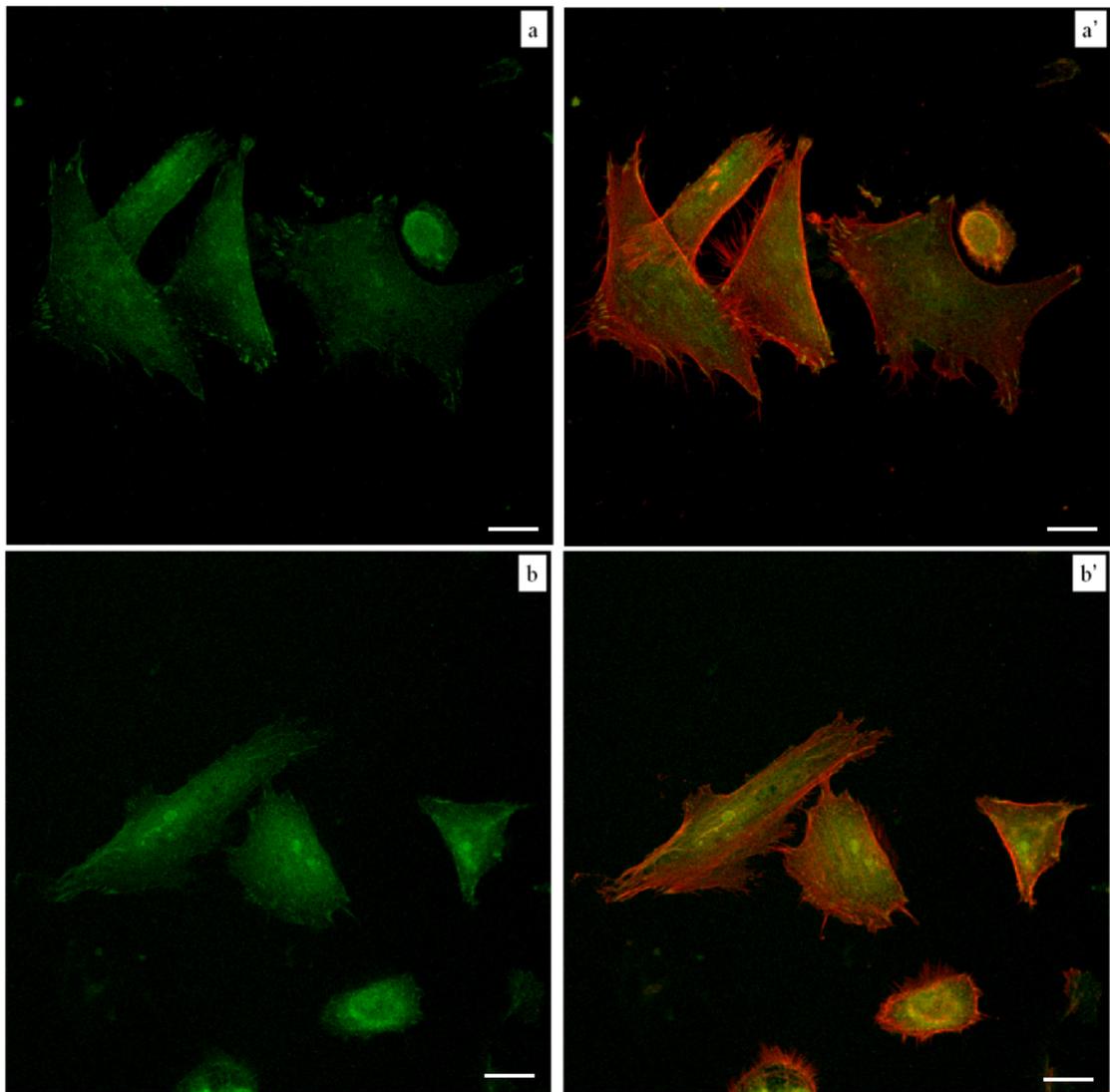


Figura 39: Espressione della **paxillina** in MG63 seminate su **PSS** a 6 ore. a-a') cellule non trattate. b-b') cellule trattate con ialuronidasi. **a, b.** paxillina, **a', b'.** paxillina in verde e actina in rosso (barra = 20 μ m, immagini rappresentative, 60x).

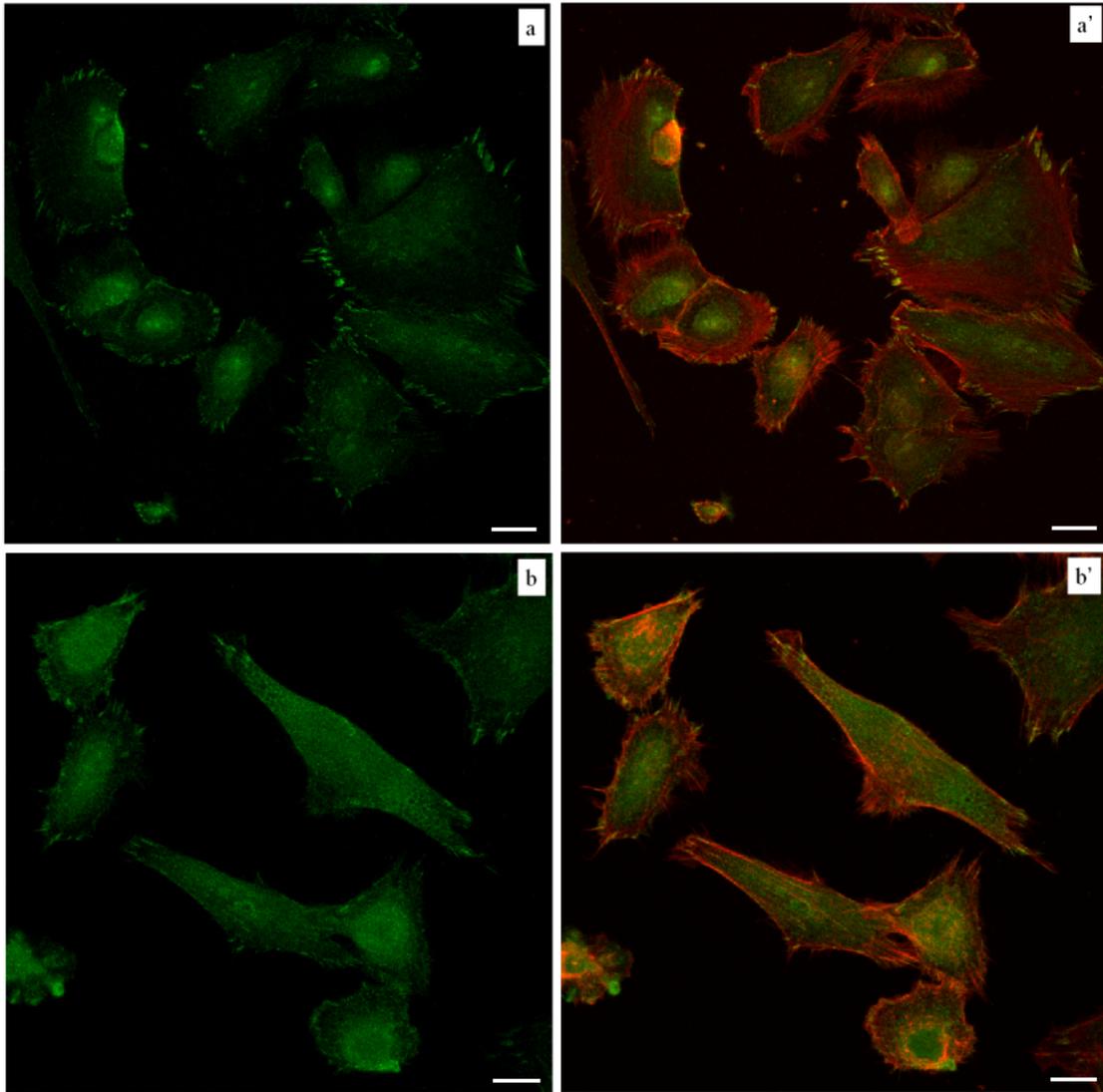


Figura 40: Espressione della **vinculina** in MG63 seminate su **PSS** a 6 ore. a-a') cellule non trattate. b-b') cellule trattate con ialuronidasi. **a, b.** vinculina, visibile in forma organizzata alla periferia cellulare **a', b'.** vinculina in verde e actina in rosso (barra = 20 μm , immagini rappresentative, 60x).

Discussione e Conclusioni

L'adesione delle cellule alla superficie dei materiali è un prerequisito per applicazioni di ingegneria tissutale e medicina rigenerativa, poiché le funzioni cellulari, quali proliferazione, sopravvivenza e differenziamento dipendono da questa prima fase. Nonostante le proprietà di un materiale, come la resistenza meccanica, la composizione chimica e la struttura, siano fondamentali, non meno importanti sono le proprietà di superficie, poiché la superficie è il primo elemento che interagisce con il tessuto dell'ospite e quindi con le cellule. Dato che le caratteristiche dei materiali come la bagnabilità, la topografia e la carica di superficie hanno tutte un forte impatto sull'adesione cellulare, numerose strategie sono state impiegate per modificare i caratteri biologicamente sfavorevoli e rendere le superfici biomimetiche, cioè simili alla matrice extracellulare⁹³

Recentemente, lo sviluppo di multistrati di polielettroliti (PEM) mediante la tecnica del assorbimento *Layer-by-Layer (LbL)* ha fornito un nuovo strumento per cambiare la superficie dei biomateriali. La deposizione dei PEM è un sistema versatile che, nel campo dei biomateriali, possiede numerosi vantaggi. I PEM sono biocompatibili poiché la tecnica di deposizione è basata su un sistema acquoso; il loro impiego non è limitato all'uso di substrati di materiale, dimensione e forma specifici; la chimica di superficie e le proprietà fisiche possono essere modulate variando i parametri di reazione come il pH e la forza ionica della soluzione.^{14,15,16,94}

In questo studio, PEM con carica diversa sono stati utilizzati per valutare il ruolo della carica di superficie sull'adesione cellulare e per esplorare la loro potenziale applicazione in campo biomedico. La tecnica utilizzata per il rivestimento delle superfici con PEM, l'assorbimento *LbL*, si è rivelata idonea, poiché ha consentito di creare superfici rivestite omogeneamente e con carica netta, positiva o negativa (Figura 16); inoltre la deposizione dei PEM non ha indotto modifiche nella rugosità del substrato, come dimostrato dall'analisi AFM.

La matrice pericellulare (*peri-cellular matrix* o pcm) è stata identificata come elemento che regola l'adesione iniziale della cellula al substrato modulando la

formazione delle adesioni focali.^{73,76} Essendo la carica netta della matrice negativa per la presenza dei gruppi carbossilici dell'acido ialuronico, è stato ipotizzato da alcuni autori un'adesione preferenziale delle cellule che utilizzano tale matrice a substrati che presentano cariche positive.⁹⁵ Risultati contrastanti sulla risposta cellulare alla carica di superficie sono però riportati in letteratura.^{96,97,98}

In questa ricerca è stata valutata l'interazione delle cellule con PEI, un polielettrolita con carica positiva, e con PSS, dotato di carica negativa, e il processo di adesione su questi PEM è stato messo a confronto con le caratteristiche di adesione a substrati noti per promuovere l'adesione cellulare, quali la fibronectina e il collagene di tipo I. Nello studio dell'interazione abbiamo inoltre valutato se l'assenza di matrice pericellulare influenzava la risposta cellulare.

L'adesione delle cellule ai vari substrati è stata determinata a tempi brevi, cioè a 1, 3 e 6 ore dalla semina, per evidenziare le prime fasi di interazione. Come atteso, la migliore risposta cellulare è stata ottenuta sulla fibronectina, dove le cellule aderivano e iniziavano a distendersi rapidamente (Figura 23). Sugli altri substrati l'adesione avveniva più lentamente, e in particolare su PEI, dove il numero di cellule che aderivano inizialmente era molto scarso (<15% del numero totale di cellule presenti) mentre un'ottima risposta è stata ottenuta per PSS (>60% del numero totale di cellule presenti). Quando le cellule venivano trattate con ialuronidasi, e quindi private della matrice di ialuronano, l'effetto era diverso a seconda del substrato. Infatti non sono state riscontrate differenze tra cellule non trattate e cellule senza matrice né sulla fibronectina né sul PSS, in quanto le cellule adese erano sia come numero che come morfologia molto simili. Questo probabilmente è dovuto alla presenza su tali substrati di forti segnali per la cellula, come la sequenza RGD nella fibronectina e i gruppi solfonici nel PSS,⁹⁹ che potrebbero non richiedere l'intermediazione della matrice pericellulare. Considerando che sia questi substrati che la matrice pericellulare hanno una carica netta negativa, l'ipotesi suggerita è che quando le cellule con la matrice pericellulare entrano in contatto con substrati carichi negativamente, che

presentano però dei segnali 'adesivi', riassorbono la matrice per stabilire subito dei legami 'forti' con il substrato. In questo processo le cellule prive di matrice potrebbero essere facilitate dall'interazione elettrostatica, come osservato sul PSS, dove le cellule presentavano inizialmente un maggior numero di cellule adese, rispetto alle cellule non trattate (Figura 36). Questa ipotesi è supportata dall'organizzazione della matrice pericellulare su tali substrati: la pcm era presente su poche cellule e localizzata soprattutto ai lati del corpo cellulare. Una tale distribuzione è già stata osservata in cellule in fase di locomozione e ha suggerito l'ipotesi che la matrice pericellulare supporti questo processo agendo come lubrificante lungo l'interfaccia membrana plasmatica/substrato¹⁰⁰ durante la migrazione: questo spiegherebbe inoltre i residui di matrice osservati su entrambi i substrati (Figure 24 e 37). La consistenza della matrice su questi substrati appariva infatti più lassa e meno compatta; questo potrebbe dipendere dal metodo utilizzato in questo studio per evidenziare la matrice pericellulare, che prevede l'uso di proteine che legano in maniera specifica solo le catene di acido ialuronico. Dato che la composizione in proteoglicani della matrice pericellulare dipende dal tipo di cellula e dal tipo di substrato, si potrebbe ipotizzare che sulla fibronectina e sul PSS la concentrazione dei proteoglicani sia più alta, così da allontanare le catene di ialuronano e risultare in una marcatura meno compatta.

Come già citato, la matrice pericellulare stabilizza i contatti focali.^{76,77} Quando le cellule venivano coltivate in condizioni normali, apparivano distese e con citoscheletro ben organizzato, con numerose adesioni focali su entrambi i substrati (Fn e PSS). Le cellule senza la matrice mostravano invece forma allungata e citoscheletro organizzato sulla fibronectina, dove non sono state osservate differenze nell'organizzazione dei contatti focali, se non una leggera riduzione della presenza dell'integrina $\beta 1$ (Figura 23). Queste osservazioni confermano l'ipotesi che lo stimolo fornito da questo substrato consente alla cellula di fare a meno della matrice pericellulare per l'adesione, ma che la sua funzione sia legata più alla motilità cellulare, come suggerito anche dalla minore presenza di integrina $\beta 1$ sulle cellule private della matrice.¹⁰¹

Per quanto riguarda il PSS, l'assenza di matrice pericellulare induceva nelle cellule una minore organizzazione del citoscheletro e una notevole riduzione della formazione dei contatti focali, dimostrato dalla riduzione della vinculina e della quasi totale assenza della paxillina nella loro forma organizzata (Figure 39 e 40). Tali risultati, supportati dall'osservazione in *time-lapse*, indicano che l'attacco delle cellule al PSS non è strettamente dipendente dalla presenza della matrice pericellulare, ma questa struttura si rivela poi fondamentale nell'organizzazione e mantenimento delle strutture di adesione, strutture che regolano numerosi processi cellulari, quali proliferazione e differenziamento cellulare.^{70,71,72} Sul PermanoX® e sul collagene le cellule prive di matrice cellulare aderivano con più difficoltà al substrato; infatti era osservabile una notevole riduzione delle cellule adese, che mostravano inoltre una morfologia sferica. Anche sul collagene è nota la presenza di sequenze di adesione per le cellule, come per la fibronectina, ma a differenza di quest'ultima, il collagene presenta una carica netta pari a zero. Probabilmente l'adesione delle cellule prive di matrice a questi motivi adesivi non viene favorita dall'interazione elettrostatica, risultando necessario il contributo della matrice. Su collagene la matrice pericellulare era presente su tutte le cellule ed era abbondante. In particolare la pcm si organizzava intorno alle cellule secondo due modalità diverse: o ai lati del corpo cellulare nelle cellule ben adese e distese, quindi pronte alla migrazione, come riportato sopra, mentre era abbondante e omogeneamente distribuita intorno al corpo cellulare nelle cellule adese, ma non ancora distese, con morfologia sferica. Questa distribuzione è stata già osservata in cellule appena adese,¹⁰² o in cellule che si distaccano dal substrato per andare incontro a mitosi, e suggerisce l'ipotesi che le cellule producano un'abbondante matrice intorno a tutta la cellula quando non sono fortemente ancorate ad un substrato. In questo caso la pcm assume la funzione di 'sentire' l'ambiente circostante. Una volta avvenuto il contatto, la matrice si ridistribuisce intorno alla cellula o viene degradata a seconda delle attività cellulari. Anche sul collagene l'organizzazione del citoscheletro e la formazione dei contatti focali erano compromessi dall'assenza della matrice pericellulare, indicando

L'importanza della matrice nell'interazione con questo tipo di substrato, non solo nell'interazione primaria ma anche nella successiva maturazione delle strutture di adesione. Sul Permanox®, le MG63 non formano adesioni focali ma solo complessi focali tardivi, come evidenziato dalla marcatura della vinculina, mentre l'actina era invece organizzata in fibre (Figura 22). Le cellule prive di matrice presentavano il citoscheletro disorganizzato e la morfologia alterata. Non sono state invece osservate differenze nell'espressione delle molecole d'adesione (figure 20, 21, 22). Questo avviene perché su questo substrato tali proteine sono poco espresse anche in condizioni normali, e conseguentemente non è stato possibile effettuare un'analisi precisa. Inoltre, come visto su collagene e PSS, l'effetto maggiore dell'assenza di matrice si osservava sulla paxillina. Appare comunque evidente che su questo substrato la matrice pericellulare svolge un ruolo fondamentale sia sull'organizzazione citoscheletrica, e di conseguenza sulla distensione cellulare, sia sull'adesione, dimostrato anche dal minore numero di cellule adese e dal notevole numero di cellule di forma sferica dopo rimozione della pcm.

L'adesione delle cellule al PEI invece è scarsa anche in presenza di matrice pericellulare, con un'adesione massima pari a circa il 50% delle cellule seminate. È stato già riportato in letteratura un effetto citotossico di tale polielettrolita, ma a concentrazioni di utilizzo di 5 mg/ml,^{103,104} mentre in questo studio i polielettroliti sono stati utilizzati ad una concentrazione di 1 mg/ml. Le cellule adese mantenevano nel tempo una morfologia sferica con citoscheletro disorganizzato e assenza di strutture di adesione. La matrice pericellulare era abbondante intorno alla cellule, e quando eliminata, l'adesione cellulare era significativamente ridotta (Figura 33).

In conclusione, l'insieme di questi risultati indicano che il ruolo della matrice pericellulare nel processo di adesione dipende fortemente dal tipo di substrato; la sua presenza risulta poco rilevante quando si presentano substrati fortemente adesivi che possiedono anche una specifica carica di superficie, come la fibronectina e il PSS; l'interazione con substrati adesivi, ma che non presentano una carica di superficie favorevole, come il collagene, necessitano della presenza

di matrice pericellulare per migliorare le fasi di adesione; infine, quando si tratta di substrati poco affini, quali PermanoX® o PEI, il contributo della matrice pericellulare diventa fondamentale, poiché la sua assenza compromette in maniera drastica il processo di adesione. È comunque importante sottolineare che su tutti i substrati la presenza della matrice è risultata necessaria per la stabilizzazione delle strutture di adesione: da qui la necessità di ulteriori ricerche per valutare gli eventi cellulari successivi, come la migrazione, la proliferazione e il differenziamento cellulare.

Come superficie biomimetica, il PSS si è rivelato un ottimo substrato, poiché di facile preparazione e in grado di sostenere e promuovere l'adesione anche di cellule danneggiate. Ulteriori studi sono però necessari per valutare la capacità di tale substrato di supportare la proliferazione e il differenziamento cellulare in particolare di cellule di origine primaria.

Bibliografia

-
- ¹ Brighton CT, Hunt RM. Early histological and ultra-structural changes in medullary fracture callus. *J Bone Joint Surg.* 1991; 73A:832-47.
- ² Shea CM, Edgar CM, Einhorn TA, Gerstenfeld L. BMP treatment of C3H10T1/2 mesenchymal stem cells induces both chondrogenesis and osteogenesis. *J Cell Biochem.* 2003; 90:1112-27.
- ³ Iwaki A, Jingushi S, Oda Y, Izumi T, Shida JI, Tsuneyoshi M, Sugioka Y. Localization and quantification of proliferating cells during rat fracture repair. Detection of proliferating cell nuclear antigen by immunohistochemistry. *J Bone Miner Res.* 1997; 12:96-102.
- ⁴ Nakagawa Y, Shimizu K, Hamamoto T, Suzuki K, Ueda R, Yamamuro T. Calcium-dependent neutral protease (Calpain) in fracture healing in rats. *J Orthop Res.* 1994; 12:58-69.
- ⁵ Deckers MM, Van Beek ER, Van Der Pluijm G, Wetterwald A, Van Der Wee-Pals L, Cecchini MG, Papapoulos SE, Löwik CW. Dissociation of angiogenesis and osteoclastogenesis during endochondral bone formation in neonatal mice. *J Bone Miner Res.* 2002;17:998-1007.
- ⁶ Lee FY, Choi YW, Behrens FF, DeFouw DO, Einhorn TA. Programmed removal of chondrocytes during endochondral fracture healing. *J Orthop Res.* 1998; 16:144-50.
- ⁷ Gerstenfeld LC, Alkhiary YM, Krall EA, Nicholls FH, Stapleton SN, Fitch JL, Bauer M, Kayal R, Graves DT, Jepsen KJ, Einhorn TA. Three-dimensional reconstruction of fracture callus morphogenesis. *J Histochem Cytochem.* 2006; 54:1215-28.
- ⁸ Eriksen EF, Eghbali-Fatourehchi GZ, Khosla S. Remodeling and vascular spaces in bone. *J Bone Miner Res.* 2007; 22:1-6.
- ⁹ Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A. Clarification of nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2005; 5:393-5.
- ¹⁰ Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006; 8:315-7.
- ¹¹ Giordano A, Galderisi U, Marino I. From the laboratory bench to the patient's bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol.* 2007; 211:27-35.
- ¹² Bielby R, Joens E, McGonagle D. The role of mesenchymal stem cells in maintenance and repair of bone. *Injury.* 2007; 3851:S26-S32.

-
- ¹³ Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol.* 2006; 24:150-4.
- ¹⁴ Popp FC, Piso P, Schlitt HJ, Dahlke MH. Therapeutic potential of bone marrow cells for liver diseases. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2006; 1: 411-8.
- ¹⁵ Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell.* 2006; 126:677-89.
- ¹⁶ Hadjiargyrou M, Lombardo F, Zhao S, Ahrens W, Joo J, Ahn H, Jurman M, White DW, Rubin CT. Transcriptional profiling of bone regeneration. Insight into the molecular complexity of wound repair. *J Biol Chem.* 2002; 277:30177-82.
- ¹⁷ Kalfas IH. Principles of bone healing. *Neurosurg Focus.* 2001; 10:E1.
- ¹⁸ Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop.* 1998; 355S:S7-S21.
- ¹⁹ Day TF, Guo X, Garrett-Beal L, Yang Y. Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev Cell.* 2005; 8:739-50.
- ²⁰ Mbalaviele G, Sheikh S, Staine JP, Salazar VS, Cheng SL, Chen D, Civitelli R. Beta-catenin and BMP-2 synergize to promote osteoblast differentiation and new bone formation. *J Cell Biochem.* 2005; 94: 403-18.
- ²¹ Chubinskaya S, Merrihew C, Cs-Szabo G, Mollenhauer J, McCartney J, Rueger DC, Kuettner KE. Human articular chondrocytes express osteogenic protein-1. *J Histochem Cytochem.* 2000; 48: 239-50.
- ²² Deckers MM, van Bezooijen RL, van der Horst G, Hoogendam J, van Der Bent C, Papapoulos SE, Löwik CW. Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A. *Endocrinology.* 2002; 143:1545-53.
- ²³ Kanatani M, Sugimoto T, Kaji H, Kobayashi T, Nishiyama K, Fukase M, Kumegawa M, Chihara K. Stimulatory effect of bone morphogenetic protein-2 on osteoblast-like cell formation and bone-resorbing activity. *J Bone Miner Res.* 1995; 10:1681-90.
- ²⁴ Barnes GL, Kostenuik LC, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Growth factor regulation of fracture repair. *J Bone Miner Res.* 1999; 14:1805-15.
- ²⁵ Sandberg MM, Hannu TA, Vuorio EI. Gene expression during bone repair. *Clin Orthop.* 1993; 289:292-312.
- ²⁶ Erlebacher A, Filvaroff EH, Ye JQ, Derinck R. Osteoblastic responses to TGF- β during bone remodeling. *Mol Biol Cell.* 1998; 9:1903-18.
- ²⁷ Quinn J M W, Itoh K, Udagawa N, Hausler K, Yasuda H, Shima N, Mizuno A, Higashio K, Takahashi N, Suda T, Martin T J, Gillespie MT. Transforming growth factor β affects osteoclast differentiation via direct and indirect actions. *J Bone Miner Res.* 2001; 16:1787-94.

-
- ²⁸ Takai H, Kanematsu M, Yano K, Tsuda E, Higashio K, Ikeda K, Watanabe K, Yamada Y. Transforming growth factor- β stimulates the production of osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor by bone marrow stromal cells. *J Biol Chem*. 1998; 273:27091-6.
- ²⁹ Jacob AL, Smith C, Partanen J, Ornitz DM. Fibroblast growth factor receptor 1 signaling in the osteochondrogenic cell lineage regulates sequential steps of osteoblast maturation. *Dev Biol* 2006; 296:315-28.
- ³⁰ Ornitz, D.M. FGF signaling in the developing endochondral skeleton. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2005; 16:205-13.
- ³¹ Engin F, Yao Z, Yang T, Zhou G, Bertin T, Jiang MM, Chen Y, Wang L, Zheng H, Sutton RE, Boyce BF, Lee B. Dimorphic effects of Notch signaling in bone homeostasis. *Nat Med*. 2008; 14:299-305.
- ³² Zou L, Zou X, Li H, Mygind T, Zeng Y, Lü N, Bünger C. Molecular mechanism of osteochondroprogenitor fate determination during bone formation. *Adv Exp Med Biol*. 2006; 585:431-41.
- ³³ Lian JB, Javed A, Zaidi SK, Lengner C, Montecino M, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS. Regulatory controls for osteoblast growth and differentiation: role of Runx/Cbfa/AML factors. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2004; 14:1-41.
- ³⁴ 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*. 2002; 1:17-29.
- ³⁵ Egermann M, Baltzer AW, Adamaszek S, Evans C, Robbins P, Schneider E, Lill CA. Direct adenoviral transfer of bone morphogenetic protein-2 cDNA enhances fracture healing in osteoporotic sheep. *Hum Gene Ther*. 2006; 17(5):507-17.
- ³⁶ Ishihara A, Shields KM, Litsky AS, Mattoon JS, Weisbrode SE, Bartlett JS, Bertone AL. Osteogenic gene regulation and relative acceleration of healing by adenoviral-mediated transfer of human BMP-2 or -6 in equine osteotomy and ostectomy models. *J Orthop Res*. 2008; 26(6):764-71.
- ³⁷ Temenoff JS, Mikos AG. *Bone Engineering* (ed. Davies, J. E.) 454–461.
- ³⁸ Webster TJ, Siegel RW, Bizios R. Osteoblast adhesion on nanophase ceramics. *Biomaterials*. 1999; 20:1221–1227
- ³⁹ Sitharaman B, Shi X, Walboomers XF, Liao H, Cuijpers V, Wilson LJ, Mikos AG, Jansen JA. In vivo biocompatibility of ultra-short-single-walled carbon nanotube/biodegradable polymer nanocomposites for bone tissue engineering. *Bone*. 2008; 43:362–370.
- ⁴⁰ Issa TK, Bahgat MA, Linthicum FH Jr. Tissue reaction to prosthetic materials in human temporal bones. *Am. J. Otol*. 1983; 5:40–43.

-
- ⁴¹ James K, Levene H, Kaufmann EE, Parsons JR, Kohn J. Bone Engineering (ed. Davies, J. E.) 195–203.
- ⁴² Ciocca L, De Crescenzo F, Fantini M, Scotti R. CAD/CAM and rapid prototyped scaffold construction for bone regenerative medicine and surgical transfer of virtual planning: a pilot study. *Comput. Med. Imaging Graph.* 2009; 33:58–62.
- ⁴³ Low KL, Tan SH, Zein SH, Roether JA, Mouriño V, Boccaccini AR. Calcium phosphate-based composites as injectable bone substitute materials. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 2010; 94:273-286.
- ⁴⁴ Khan Y, Yaszemski MJ, Mikos AG, Laurencin CT. Tissue engineering of bone: material and matrix considerations. *J. Bone Joint Surg. Am.* 2008; 90: 36–42.
- ⁴⁵ Link DP, van den Dolder J, van den Beucken JJ, Wolke JG, Mikos AG, Jansen JA. Bone response and mechanical strength of rabbit femoral defects filled with injectable CaP cements containing TGF- β 1 loaded gelatin microparticles. *Biomaterials.* 2008; 29: 675–682.
- ⁴⁶ Hollinger JO, Schmitt JM, Buck DC, Shannon R, Joh SP, Zegzula HD, Wozney J. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 and collagen for bone regeneration. *J. Biomed. Mater. Res.* 1998; 43:356–364.
- ⁴⁷ Lisignoli G, Fini M, Giavaresi G, Nicoli AN, Toneguzzi S, Facchini A. Osteogenesis of large segmental radius defects enhanced by basic fibroblast growth factor activated bone marrow stromal cells grown on non-woven hyaluronic acid-based polymer scaffold. *Biomaterials.* 2002; 23:1043–1051.
- ⁴⁸ Hong Y, Gong Y, Gao C, Shen JJ. Collagen-coated polylactide microcarriers/chitosan hydrogel composite: injectable scaffold for cartilage regeneration. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2008; 85:628–637.
- ⁴⁹ Braunecker J, Baba M, Milroy GE, Cameron RE. The effects of molecular weight and porosity on the degradation and drug release from polyglycolide. *Int. J. Pharm.* 2004; 282:19–34.
- ⁵⁰ Pişkin E, Işoğlu IA, Bölgen N, Vargel I, Griffiths S, Cavuşoğlu T, Korkusuz P, Güzel E, Cartmell S. *In vivo* performance of simvastatin-loaded electrospun spiral-wound polycaprolactone scaffolds in reconstruction of cranial bone defects in the rat model. *J. Biomed. Mat. Res. A.* 2009; 90:1137–1151.
- ⁵¹ Zhang R, Ma PX. Porous poly(L-lactic acid)/apatite composites created by biomimetic process. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 1999; 45:285–293.
- ⁵² Marcolongo M, Ducheyne P, Garino J, Schepers E. Bioactive glass fiber/polymeric composites bond to bone tissue. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 1998; 39:161–170.

-
- ⁵³ Eniwumide JO, Yuan H, Cartmell SH, Meijer GJ, de Bruijn JD. Ectopic bone formation in bone marrow stem cell seeded calcium phosphate scaffolds as compared to autograft and (cell seeded) allograft. *Eur Cell Mater.* 2007; 14: 30–38;
- ⁵⁴ Fellah BH, Gauthier O, Weiss P, Chappard D, Layrolle P. Osteogenicity of biphasic calcium phosphate ceramics and bone autograft in a goat model. *Biomaterials.* 2008; 29: 1177–1188.
- ⁵⁵ Daley WP, Peters SB, Larsen M. Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. *J Cell Sci.* 2008;121:255–264
- ⁵⁶ Bacáková L, Filová E, Rypáček F, Svorčík V, Starý V. Cell adhesion on artificial materials for tissue engineering. *Physiol Res.* 2004;53(Suppl 1):S35–45.
- ⁵⁷ Hersel U, Dahmen C, Kessler H. RGD modified polymers: biomaterials for stimulating cell adhesion and beyond. *Biomaterials.* 2003; 24: 4385-4415.
- ⁵⁸ Healy KE, Rezaia A, Style A. Designing biomaterials to direct biological response. *Ann N Y Acad Sci.* 1999; 875: 24-35.
- ⁵⁹ Kisiday J, Jin M, Kurz B, Hung H, Semino C, Zhang S, Grodzinsky AJ. Self-assembling peptide hydrogel fosters chondrocyte extracellular matrix production and cell division: implications for cartilage tissue repair. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 23;99(15):9996-10001.
- ⁶⁰ Branco MC, Schneider JP. Self-assembling materials for therapeutic delivery. *Acta Biomater.* 2009; 5(3):817-31.
- ⁶¹ Cook AD, Hrkach JS, Gao NN, Johnson IM, Pajvani UB, Cannizzaro SM, Langer R. Characterization and development of RGD-peptide-modified poly(lactic acid-co-lysine) as an interactive, resorbable biomaterial. *J Biomed Mater Res.* 1997; 35(4): 513-23.
- ⁶² Decher G, Hong JD, Schmitt J. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process. III. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces. *Thin Solid Films.* 1992; 210:831-835.
- ⁶³ Antipov AA, Sukhorukov GB. Polyelectrolyte multilayer capsules as vehicles with tunable permeability. *Adv Colloid Interface Sci.* 2004. 29; 111(1-2):49-61.
- ⁶⁴ Zhu Y, Gao C, He T, Liu X, Shen J. Layer-by-layer assembly to modify poly(l-lactic acid) surface toward improving its cytocompatibility to human endothelial cells. *Biomacromolecules.* 2003; 4(2):446-52.
- ⁶⁵ Mendelsohn, J.D., Yang, S.Y., Hiller, J., Hochbaum, A.I., Rubner, M.F. Rational design of cytophilic and cytophobic polyelectrolyte multilayer thin films. *Biomacromolecules.* 2003; 4(1): 96-106.
- ⁶⁶ Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell.* 2002; 110: 673–687
- ⁶⁷ Healy KE, Thomas CH, Rezaia A, Kim JE, McKeown PJ, Lom B, Hockberger PE. Kinetics of bone cell organization and mineralization on materials with patterned surface chemistry. *Biomaterials.* 1996; 17:195-208.

-
- ⁶⁸ Chesmel KD, Clark CC, Brighton CT, Black J. Cellular responses to chemical and morphologic aspects of biomaterial surfaces. The biosynthetic and migratory response of bone cell populations. *J Biomed Mater Res*, 1995; 29:1101-10.
- ⁶⁹ Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science*. 1999; 285:1028–1032
- ⁷⁰ Xiao G, Jiang D, Thomas P, Benson MD, Guan K, Karsenty, Franceschi RT. MAPK pathways activate and phosphorylate the osteoblast-specific transcription factor, Cbfa1. *J Biol Chem*. 2000; 275:4453–4459.
- ⁷¹ Xiao G, Gopalakrishnan R, Jiang D, Reith E, Benson MD, Franceschi RT. Bone morphogenetic proteins, extracellular matrix, and mitogen-activated protein kinase signaling pathways are required for osteoblast-specific gene expression and differentiation in MC3T3-E1 cells. *J Bone Miner Res*. 2002; 17:101–110.
- ⁷² Jaiswal RK, Jaiswal N, Bruder SP, Mbalaviele G, Marshak DR, Pittenger MF. Adult human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*. 2000; 275:9645–9652.
- ⁷³ Cohen M, Kam Z, Addadi L, Geiger B. Dynamic study of the transition from hyaluronan- to integrin-mediated adhesion in chondrocytes. *EMBO J*. 2006;25:302-11.
- ⁷⁴ Cohen M, Joester D, Geiger B, Addadi L. Spatial and temporal sequence of events in cell adhesion: from molecular recognition to focal adhesion assembly. *Chembiochem*. 2004; 5(10):1393-9.
- ⁷⁵ Toole BP. Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nature Rev Cancer*. 2004; 4:528 2004.
- ⁷⁶ Zimmerman E, Geiger B, Addadi L. Initial stages of cell-matrix adhesion can be mediated and modulated by cell-surface hyaluronan. *Biophys J*. 2002; 82(4):1848-57.
- ⁷⁷ Twarock S, Tammi MI, Savani RC, Fischer JW. Hyaluronan stabilizes focal adhesions, filopodia, and the proliferative phenotype in esophageal squamous carcinoma cells. *J Biol Chem*. 2010; 285(30):23276-84.
- ⁷⁸ Morris C, Thorpe J, Ambrosio L, Santin M. The soybean isoflavone genistein induces differentiation of MG63 human osteosarcoma osteoblasts. *J Nutr*. 2006; 136(5):1166-70.
- ⁷⁹ Santin M, Ambrosio L, Soybean-based biomaterials: preparation, properties and tissue regeneration potential. *Expert Rev Med Dev*. 2008; 5:349-358.
- ⁸⁰ Rohanzadeh R, Swain MV, Mason RS. Gelatin sponges (Gelfoam) as a scaffold for osteoblasts. *J Mater Sci Mater Med*. 2008; 19(3):1173-1182.
- ⁸¹ Montufar EB, Traykova T, Schacht E, Ambrosio L, Santin M, Planell JA, Ginebra MP. Self-hardening calcium deficient hydroxyapatite/gelatine foams for bone regeneration. *J Mater Sci Mater Med*. 2010; 21(3):863-869.

-
- ⁸² Montufar EB, Traykova T, Gil C, Harr I, Almirall A, Aguirre A, Engel E, Planell JA, Ginebra MP. Foamed surfactant solution as a template for self-setting injectable hydroxyapatite scaffolds for bone regeneration. *Acta Biomaterialia*. 2010; 6:876-885.
- ⁸³ Montufar EB, Traykova T, Schacht E, Ambrosio L, Santin M, Planell JA, Ginebra MP. Self-hardening calcium deficient hydroxyapatite/gelatine foams for bone regeneration. *J Mater Sci Mater Med*. 2010; 21(3):863-869.
- ⁸⁴ Almirall A, Larrecq G, Delgado JA, Martínez S, Planell JA, Ginebra MP. Fabrication of low temperature macroporous hydroxyapatite scaffolds by foaming and hydrolysis of an alpha-TCP paste. *Biomaterials*. 2004; 25:3671-3680.
- ⁸⁵ Raucci MG, D'Antò V, Guarino V, Sardella E, Zeppetelli S, Favia P, Ambrosio L. Biomaterialized porous composite scaffolds prepared by chemical synthesis for bone tissue regeneration. *Acta Biomater*. 2010; 6:4090-4099
- ⁸⁶ Kim HW, Knowles JC, Kim HE. Hydroxyapatite/poly([epsilon]- caprolactone) composite coatings on hydroxyapatite porous bone scaffold for drug delivery. *Biomaterials*. 2004; 25:1279-1287.
- ⁸⁷ Ginebra MP, Fernandez E, Driessens FCM, Planell JA. Modeling of the hydrolysis of alpha-tricalcium phosphate. *Journal of the American Ceramic Society*. 1999; 82: 2808-2812.
- ⁸⁸ Wang L, Fan H, Zhang ZY, Lou AJ, Pei GX, Jiang S, Mu TW, Qin JJ, Chen SY, Jin D. Osteogenesis and angiogenesis of tissue-engineered bone constructed by prevascularized β -tricalcium phosphate scaffold and mesenchymal stem cells. *Biomaterials*. 2010; 31(36):9452-61.
- ⁸⁹ Engel E, Del Valle S, Aparicio C, Altankov G, Asin L, Planell JA, Ginebra DP. Discerning the role of topography and ion exchange in cell response of bioactive tissue engineering scaffolds. *Tissue Eng A*. 2008; 14:1341-351.
- ⁹⁰ Yuasa T, Miyamoto Y, Ishikawa K, Takechi M, Momota Y, Tatehara S, Nagayama M. Effects of apatite cements on proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. *Biomaterials* 2004; 25:1159-1166.
- ⁹¹ Hamilton DW, Brunette DM. The effect of substratum topography on osteoblast adhesion mediated signal transduction and phosphorylation. *Biomaterials*. 2007; 28:1806-1819.
- ⁹² Orkin RW, Knudson W, Toole BP. Loss of hyaluronate-dependent coat during myoblast fusion. *Dev Biol*. 1985; 107:527-30
- ⁹³ Ma Z, Mao Z, Gao C. Surface modification and property analysis of biomedical polymers used for tissue engineering. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2007; 60:137-157.
- ⁹⁴ Chien HW, Chang TY, Tsai WB. Spatial control of cellular adhesion using photo-crosslinked micropatterned polyelectrolyte multilayer films. *Biomaterials*. 2009; 30(12):2209-18.

-
- ⁹⁵ Finke B, Luethen F, Schroeder K, Mueller PD, Bergemann C, Frant M, Ohl A, Nebe BJ. The effect of positively charged plasma polymerization on initial osteoblastic focal adhesion on titanium surfaces. *Biomaterials*. 2007; 28(30):4521-34.
- ⁹⁶ Bodhak S, Bose S, Bandyopadhyay A. Electrically polarized HAp-coated Ti: in vitro bone cell-material interactions. *Acta Biomater*. 2010; 6(2):641-51.
- ⁹⁷ Thian ES, Ahmad Z, Huang J, Edirisinghe MJ, Jayasinghe SN, Ireland DC, Brooks RA, Rushton N, Bonfield W, Best SM. The role of surface wettability and surface charge of electrosprayed nanoapatites on the behaviour of osteoblasts. *Acta Biomater*. 2010; 6(3):750-5.
- ⁹⁸ Guo L, Kawazoe N, Hoshihara T, Tateishi T, Chen G, Zhang X. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on chargeable polymer-modified surfaces. *J Biomed Mater Res A*. 2008; 87(4):903-12.
- ⁹⁹ Kowalczyńska HM, Nowak-Wyrzykowska M. Modulation of adhesion, spreading and cytoskeleton organization of 3T3 fibroblasts by sulfonic groups present on polymer surfaces. *Cell Biol Int*. 2003; 27(2):101-14.
- ¹⁰⁰ Evanko SP, Angello JC, Wight TN. Formation of hyaluronan- and versican-rich pericellular matrix is required for proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999; 19(4):1004-13.
- ¹⁰¹ Maaser K, Wolf K, Klein CE, Niggemann B, Zanker KS, Brocker EB, Friedl P. Functional hierarchy of simultaneously expressed adhesion receptors: integrin alpha2beta1 but not CD44 mediates MV3 melanoma cell migration and matrix reorganization within three-dimensional hyaluronan-containing collagen matrices. *Mol Biol Cell*. 1999; 10:3067-3079.
- ¹⁰² Cohen M, Klein E, Geiger B, Addadi L. Organization and adhesive properties of the hyaluronan pericellular coat of chondrocytes and epithelial cells. *Biophys J*. 2003; 85(3):1996-2005.
- ¹⁰³ Brunot C, Ponsonnet L, Lagneau C, Farge P, Picart C, Grosogeat B. Cytotoxicity of polyethyleneimine (PEI), precursor base layer of polyelectrolyte multilayer films. *Biomaterials*. 2007; 28(4):632-40.
- ¹⁰⁴ Tryoen-Tóth P, Vautier D, Haikel Y, Voegel JC, Schaaf P, Chluba J, Ogier J. Viability, adhesion, and bone phenotype of osteoblast-like cells on polyelectrolyte multilayer films. *J Biomed Mater Res*. 2002; 60(4):657-67.