

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA
IN

BIOTECNOLOGIE DELLO SVILUPPO E DELLA
RIPRODUZIONE

Ciclo XX

SSD: BIO/13

DIFFERENZIAMENTO MACROFAGICO: GLI EFFETTI DEI POLIMERI
SINTETICI

Presentata da: Dott.ssa Alessandra Scordari

Coordinatore Dottorato

Ch.ma Prof.ssa Elisabetta Caramelli

Relatore

Ch.ma Prof.ssa Marina Marini

Correlatore

Ch.ma Prof.ssa Luciana Dini

Esame finale anno 2008

INDICE

1. Introduzione.....	1
1.1 Ingegneria tessutale: cenni storici.....	1
1.2 I biomateriali.....	5
1.2.1 Classificazione dei biomateriali.....	8
1.3 I polimeri in medicina.....	19
1.3.1 <i>I fillers</i>	20
1.3.2 Composizione della pelle.....	21
1.3.3 Classificazione dei <i>fillers</i>	22
1.3.4 <i>Fillers</i> naturali.....	24
1.3.5 <i>Fillers</i> sintetici.....	34
1.4 Risposta immune all'impianto di un biomateriale.....	48
1.4.1 L'inflammation.....	50
1.4.2 Assorbimento proteico sulla superficie del biomateriale.....	54
1.4.3 Cellule effettrici della risposta infiammatoria.....	60
1.4.4 Mediatori chimici della risposta immune.....	74
1.5 Valutazione della biocompatibilità.....	81
2. Scopo della tesi.....	96
3. Materiali e metodi.....	98
3.1 Biopolimeri.....	98
3.2 Linee cellulari.....	99
3.2.1 Mantenimento della coltura.....	100

3.2.3	Tecniche di congelamento e scongelamento.....	101
3.3	Schema degli esperimenti.....	102
3.4	Osservazioni morfologiche.....	104
3.5	Colorazione con ematossilina-eosina.....	104
3.6	Colorazione con blu di toluidina.....	105
3.7	Test colorimetrici.....	106
3.8	Test di fagocitosi con particelle di <i>latex</i>	109
3.9	Test di endocitosi in fase fluida con <i>Lucifer Yellow</i>	109
3.10	Immunolocalizzazioni.....	110
3.11	Test ELISA.....	114
3.12	Dosaggio dell'Ossido Nitrico.....	118
3.13	Preparativa SEM.....	119
3.14	Analisi statistica dei dati.....	120
4.	Risultati.....	121
4.1	Analisi citotossicologiche.....	121
4.2	Osservazioni morfologiche.....	127
4.3	Attivazione macrofagica.....	138
5.	Discussione dei risultati e conclusioni.....	157
	Bibliografia.....	163

1. INTRODUZIONE

1.1 Ingegneria tessutale: cenni storici

L'ingegneria tessutale (TE) è stata definita “una scienza multidisciplinare che applica i principi dell'ingegneria e della medicina allo scopo di realizzare sostituti biologici in grado di ripristinare, mantenere o migliorare le funzioni di un tessuto o di un intero organo” (Skalak and Fox, 1988). Essa prevede due tipi di approcci: quelli *sostitutivi*, il cui scopo è, appunto, quello di costruire *ex vivo* tessuti o organi del tutto simili a quelli utilizzati nei trapianti, e quelli *istioconduttivi* o *istioinduttivi in vivo*, con lo scopo di ottimizzare la struttura e la composizione di materiali di origine naturale o (semi)sintetica, di indurre la proliferazione di cellule in vivo, utilizzando fattori di crescita altamente specifici e citochine (Klaus-J. Walgenbach *et al.*, 2001).

L'ingegneria tessutale rappresenta una valida e promettente alternativa al trapianto di organi, perché questi, pur recuperando integralmente la funzionalità dell'organo da sostituire, si scontrano con due limiti: il rigetto, ossia la risposta immunitaria negativa dell'organismo, e la scarsa disponibilità di organi, basti pensare che solo nel 2000 negli Stati Uniti 72000 persone erano in lista d'attesa per un trapianto, ma ne sono stati eseguiti solo 23000 (Port, 2002).

La stretta collaborazione tra le scienze dei materiali, la biologia (cellulare, molecolare e genetica), la medicina (embriologia, anatomia, fisiologia) e l'imprenditoria industriale è un prerequisito fondamentale per sviluppare materiali applicabili alla TE. Soltanto una conoscenza approfondita dei diversi componenti coinvolti (biomateriali, cellule, geni, citochine) può portare al successo nella manipolazione dei processi riparativi (Langer and Vacanti, 1993, 1999).

Charles Vacanti, direttore del laboratorio di ingegneria dei tessuti al Massachusetts General Hospital di Boston rappresenta, insieme al figlio Joseph, il pioniere, nonché il fondatore, della “Tissue Engineering Society” (Boston, 1994).

Vacanti considera il passo della Genesi “*il Signore Iddio fece cadere un sonno profondo sull'uomo e mentre dormiva prese una costola da lui e al posto di essa formò di nuovo la carne. E il Signore Iddio della costola tolta all'uomo formò la donna...*” la più antica testimonianza scritta con riferimento all'ingegneria tessutale (Vacanti, 2006).

In realtà, l'utilizzo di materiali prodotti dall'uomo per la sostituzione di parti del corpo ha origini ben più antiche di quelle cristiane: "È intuitivo pensare che, in ogni tempo, colui che ebbe la sventura di subire una grave lesione invalidante abbia tentato di provvedersi di una protesi adatta a compensare il danno anatomico e funzionale ricevuto e, di conseguenza, a ovviare almeno in parte alla incapacità di guadagno da essa derivante..." (Bonora F., 1965).

Sebbene gli ideali di forme armoniose e di bellezza in genere, nelle civiltà greche e romane, portavano a mal tollerare descrizioni o raffigurazioni di gravi e deturpanti infermità, sono state tuttavia reperite isolate notizie di qualche autore: Erodoto (Storie, I.IX, cap. 38) narra che l'indovino Egesistrato, dopo essersi tagliato un piede per sfuggire alla prigionia dei Lacedemoni, si applicò un piede di legno; Plinio (Historiae naturali libri VII, cap. 28) racconta che il bisnonno di Catilina, M. Sergio, si fece costruire una mano di ferro per sostituire la propria, perduta in seguito a ferite riportate durante la II° Guerra Punica.

Presso il Louvre è in mostra un vaso greco italico del IV° secolo a.C. raffigurante il "Satiro storpio", figura di fauno priva della gamba destra, amputata a livello del ginocchio, e del piede sinistro; la prima è sostituita da un bastone che passa attraverso i fasci muscolari, il piede è sostituito da uno zoccolo.

Per quel che riguarda i reperti archeologici relativi a protesi degli arti, si ha notizia del ritrovamento, a Capua nel 1858, di una gamba in bronzo, legno e ferro venuta alla luce durante alcuni scavi in una tomba risalente al III° secolo a.C.. I ritrovamenti di protesi artificiali modellate in legno risalenti agli egizi (fig. 1.1) e di protesi dentarie, in particolare etrusche, sono numerosi. L'interesse di quest'ultime risiede sia nella raffinata tecnologia impiegata (ponti e capsule di fattura moderna), sia nell'uso dei materiali più vari, come, ad esempio, l'esemplare di una capsula fatta con un dente naturale conservata al Museo-Documentario dell'Istituto di Storia della Medicina dell'Università di Roma.

La scarsità di dati riguardo all'utilizzo di protesi durante l'Età Classica continua anche durante il primo Medioevo; mentre tra il XIII° e XIV° secolo esistono diverse raffigurazioni di protesi usate essenzialmente da storpi e lebbrosi, come nel battistero di Parma, in quello di Firenze realizzate da Andrea Pisano, e nelle varie opere di Brueghel, Cornelius, Mastys e Gerolamo Bosch.

È solo nel secolo XVI°, in piena Età Rinascimentale, che il mutilato, lo storpio è circondato da un nuovo interesse che tende a toglierlo dall'isolamento nel quale era

confinato, non più abbandonato alla pietà cristiana del Medioevo o completamente ignorato come nel Periodo Greco-Romano.



Fig. 1.1: mummia egiziana di 3000 anni fa con alluce in legno.

Le protesi realizzate in questo periodo, oltre ad essere più elaborate e più funzionali di quelle molto grezze dei secoli precedenti, denunciano accanto al miglioramento tecnologico anche una differenza più profonda dovuta a una nuova mentalità.

Prove in tal senso vengono date da diverse opere: nel *Pantateuchon Chirurgicum* (Acquapendente G.F., 1616) viene annesso il disegno di Gerolamo Fabrizi d'Acquapendente intitolato "Uomo delle protesi", dove è rappresentata una forma di uomo le cui membra e parti del corpo sono sostituite da apparecchi protesici.

L'aspetto più importante va ricercato nell'opera di Ambrogio Parè, intitolata "*De Deficientium supplemento*", nella quale per la prima volta il problema dell'intervento protesico diventa un problema medico, sebbene si ricorra sempre all'artigiano del ferro per la realizzazione pratica. In questa stessa opera vengono trattate e discusse una serie di protesi che riguardano occhi artificiali in oro, nasi corredati o meno di labbro superiore, protesi dentarie, protesi per il palato, per la lingua, per l'orecchio esterno, per l'apparato genito-urinario, oltre a svariate soluzioni riguardanti arti artificiali tra cui è di particolare importanza la "mano del piccolo Loreense".

La protesi venne costruita da un artigiano della Lorena e abbinava alla raffinatezza dei dettagli anche una certa funzionalità. La mano veniva collegata per mezzo di due aste e di corregge di cuoio e risultava rigida al livello del polso, poteva però muovere le dita grazie all'utilizzo di molle, che ne permettevano l'estensione, e di piccole ruote dentate, grazie alle quali avveniva la flessione (fig. 1.2).



Fig. 1.2: “Mano del piccolo Lorence”. Si possono valutare in dettaglio i particolari delle molle e delle piccole ruote necessarie al movimento dell’arto artificiale (modificato da De Deficientium supplemento).

I passi successivi furono la nascita dell’ortopedia e il riconoscimento della necessità di affiancare al chirurgo e all’ortopedico il tecnico adatto a studiare, con i primi, il modo di fabbricare una protesi idonea alle esigenze del malato.

Per secoli, il ferro, il legno, il cuoio sono stati dominatori incontrastati in queste applicazioni. In rare occasioni si osserva l’apparizione anche di metalli nobili ai quali non si è cercato alternative; ciò significa che non esistevano biomateriali, ma solo materiali confinati a opere all’esterno dell’organismo.

Quello che mancava per il raggiungimento dei biomateriali era essenzialmente il patrimonio cognitivo; uomini come Lister, Pauster, Klebs o Koch aprirono una nuova pagina della medicina e indirettamente crearono i primi presupposti perché l’“interno” dell’uomo diventasse una terra di conquista per la tecnologia al servizio dell’uomo stesso.

Negli ultimi 35 anni, lo sviluppo e la diversificazione di dispositivi e impianti medicali basati sui biomateriali ha portato il mondo della medicina verso quella che è

stata la più grande rivoluzione terapeutica dei nostri tempi. Tale sviluppo è stato possibile grazie al forte aumento delle conoscenze relative alle interazioni tra organismi viventi e materiali.

È chiaro che l'impiego di materiali all'interno del corpo per la sostituzione di organi o tessuti naturali è tanto più sicuro e dà risultati tanto positivi quanto più chiare e prevedibili sono queste interazioni.

Il problema nell'utilizzo del biomateriale non è solo da ricercarsi nella "tollerabilità" del materiale da parte dell'organismo ma anche nella sua funzionalità.

Un biomateriale deve essere in grado di interagire positivamente con i tessuti ed esplicare quelle funzioni per le quali è stato progettato ed impiegato.

1.2 I biomateriali

La premessa di base dell'ingegneria tessutale consiste nel combinare la giusta tipologia cellulare con il giusto materiale, in condizioni che permettano la formazione di un tessuto. La natura del materiale e le sue proprietà chimiche e fisiche sono fondamentali per creare le condizioni favorevoli alla formazione del tessuto (E. Lavik and R. Langer , 2004).

L'utilizzo dei biomateriali è cresciuto rapidamente alla fine del 1800, in particolare dopo l'avvento delle tecniche chirurgiche antisettiche sviluppate dal Dr. Joseph Lister nel 1860. I primi dispositivi metallici per correggere fratture ossee furono introdotti agli inizi del diciannovesimo secolo; la prima protesi sostitutiva di un'intera anca fu impiantata nel 1938 e tra il 1950 e il 1960 furono introdotti i polimeri per la sostituzione della cornea e dei vasi sanguigni. Ai nostri giorni i biomateriali hanno applicazioni che riguardano l'intero corpo umano (fig. 1.3) e consentono ogni anno il miglioramento della qualità di vita di milioni di persone; quello dei biomateriali è un campo di ricerca in costante crescita dove nuove applicazioni vengono continuamente sviluppate. Nonostante ciò, molto resta ancora da capire, in particolare la risposta biologica da essi scatenata e il loro ruolo nel guidare la rigenerazione dei tessuti: ciò continua a motivare i ricercatori nello sviluppo di nuovi prodotti (Kuhn L.T., 2005).

Una delle prime definizioni descriveva il biomateriale come: "Una qualsiasi sostanza (diversa da un farmaco) o combinazione di sostanze, d'origine naturale o sintetica,

che possano essere impiegate per un qualsiasi periodo di tempo, da sole o come parte di un sistema che tratta, aumenta o sostituisce un qualunque tessuto, organo o funzione del corpo” (Galletti P. *et al.*, 1983).

Tale definizione venne proposta nel Novembre del 1983 in occasione del *Consensus Development Conference on Clinical Application of Biomaterials*, ma aveva il problema di essere troppo ampia e non permetteva di distinguere tra un materiale tradizionale, che può occasionalmente trovare un impiego in campo biomedico, ed un materiale che invece interagisce positivamente con l’organismo vivente.

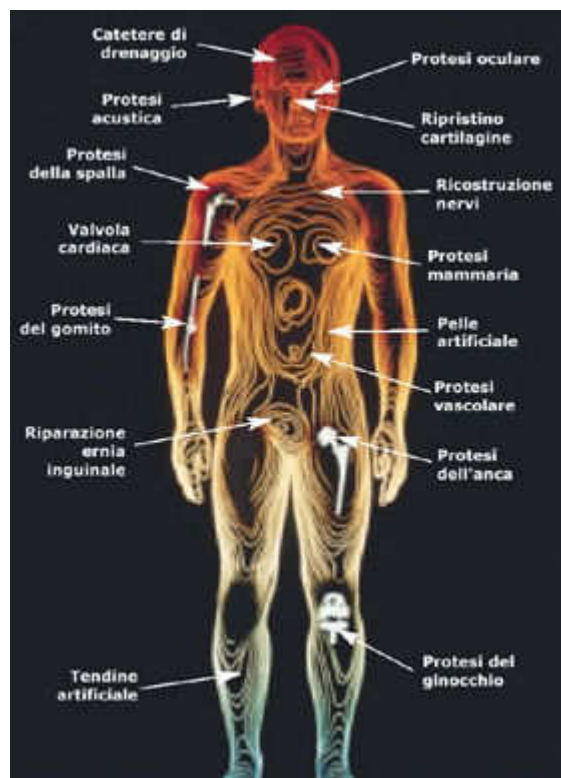


Fig. 1.3: Applicazioni dei biomateriali.

A tal proposito, durante il *II° International Consensus Conference on Biomaterials*, nel 1991 (Cheser, U.K.), venne formulata una più completa definizione di biomateriale, che vedeva questo come “un materiale concepito per interfacciarsi con i sistemi biologici per valutare, dare supporto o sostituire un qualsiasi tessuto, organo o funzione del corpo”.

I biomateriali hanno risposto al bisogno dell’uomo di sostituire o integrare tessuti ed organi, non più attivi dal punto di vista funzionale o metabolico, danneggiati da eventi traumatici o patologici.

Il numero delle loro applicazioni è cresciuto notevolmente in questi ultimi anni e la portata delle innovazioni terapeutiche ha consentito a molti pazienti la sopravvivenza o la restituzione di funzionalità compromesse dell'organismo.

Le principali funzioni richieste ai biomateriali sono (Salernitano E., 2002):

- La trasmissione del carico e distribuzione dello sforzo: il dispositivo deve interferire il meno possibile nella trasmissione dei carichi. La progettazione del materiale deve essere tale da tener presente, oltre alle caratteristiche meccanico-statiche, anche il comportamento a fatica, la resistenza allo scorrimento plastico (*creep*), le proprietà mecano-dinamiche e la resistenza alla frattura.
- La capacità articolare: la sostituzione totale o parziale di un'articolazione con un biomateriale deve necessariamente consentire il corretto movimento, avere un basso coefficiente d'attrito ad un'alta resistenza all'usura.
- Il controllo del flusso sanguigno: è molto importante la corretta progettazione di dispositivi che riproducano il pompaggio del sangue, servano come condotti per il flusso sanguigno e ne controllino la unidirezionalità.
- Il riempimento di cavità: ci si riferisce essenzialmente a dispositivi utili nella chirurgia estetica, che garantiscono il mantenimento delle caratteristiche funzionali delle parti del corpo coinvolte. I dispositivi di questo tipo sono detti *filler*, letteralmente "riempitivi".
- La generazione ed applicazione di stimoli elettrici: i dispositivi impiantabili che ripristinano o sostituiscono tali funzioni devono garantire il processo di trasmissione degli impulsi.
- La correzione della funzione visiva: i dispositivi più frequenti in questo ambito sono le lenti a contatto.
- La correzione della funzione uditiva: si fa riferimento alle protesi acustiche che si interfacciano con il sistema nervoso.
- *Carrier* di farmaci o altre sostanze: biomateriali realizzati allo scopo di veicolare i farmaci, garantendone un rilascio costante e controllato a livello di organi bersaglio.
- La rigenerazione guidata dei tessuti: tale funzione è principalmente biologica ed è molto complessa perché implica processi metabolici.

In questo quadro non è difficile pensare come oggi giorno vi sia una sempre più elevata richiesta di tali dispositivi.

È un mercato, quello dei biomateriali, in continua espansione che, solo nel 2000, ha avuto un fatturato, a livello mondiale, di 160 miliardi di euro. L'Europa è il secondo mercato in termini di fatturato dopo gli Stati Uniti; nel 2000 il suo valore di mercato, nel settore dei dispositivi medici, è stato pari a 39 miliardi di euro (fig. 1.4).

A causa di questa continua crescita, la Comunità Europea ha avvertito l'esigenza di conformare i dispositivi medici dell'industria europea ad elevati standard di sicurezza. La direttiva 93/42/CEE dà la definizione di dispositivo medico e disciplina questo settore di prodotti ed è ripresa dalla legislazione italiana con normative che regolano il settore della produzione e del commercio dei dispositivi medici con lo scopo di tutelare la sicurezza e la salute dei consumatori e degli operatori. Il mercato italiano dei biomateriali è il terzo in Europa dopo Germania e Francia, e mostra un bilancio di import/export sfavorevole (fig. 1.5) (Salernitano E., 2002).

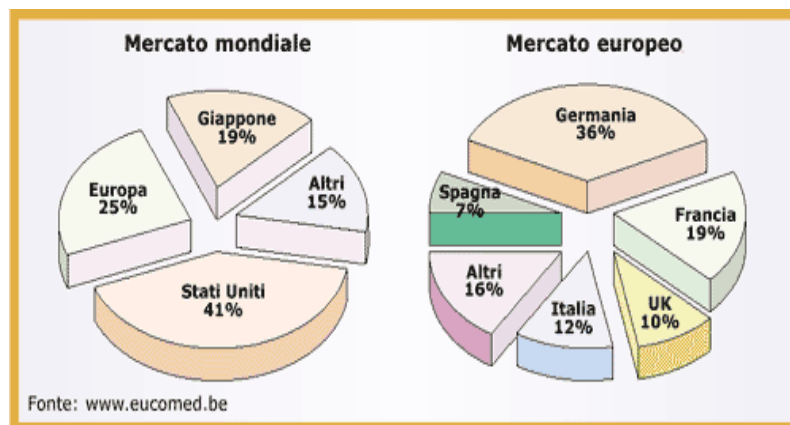


Fig. 1.4: dati relativi al mercato mondiale ed europeo dei dispositivi medici (da www.technica.net).

1.2.1 Classificazione dei biomateriali

In base alle loro applicazioni mediche, i materiali venivano classificati in tal modo (H. Suh, 1998):

- Materiali di I classe: non sono utilizzati a diretto contatto con i tessuti del corpo.
- Materiali di II classe: prendono contatto con i tessuti solo in un primo momento o in momenti diversi ad intermittenza.
- Materiali di III classe: sono costantemente a contatto con i tessuti dell'ospite.

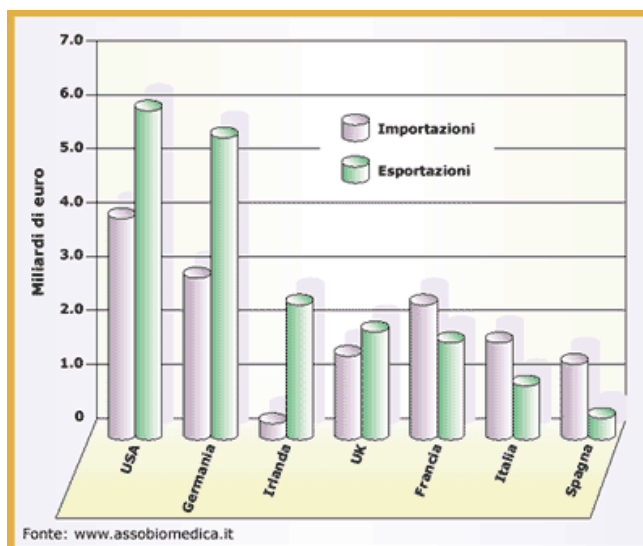


Fig. 1.5: dati relativi all'importazione ed esportazione dei dispositivi medici nelle principali nazioni europee (da www.technica.net).

Sono proprio i materiali della III classe quelli che oggi vengono definiti biomateriali o materiali biomedicali e ulteriormente suddivisi in tre categorie in base alle loro interazioni biologiche con i tessuti circostanti. Abbiamo così:

- Materiali Bio-inerti: non producono una risposta immunitaria nell'ospite e la loro struttura rimane inalterata nel corpo dopo l'impianto.
- Materiali Bio-attivi: hanno funzioni biologiche mediante le quali mimano il tessuto in cui sono stati impiantati
- Materiali Biodegradabili: vengono lentamente degradati dall'ospite e rimpiazzati con tessuto naturale rigenerato (Williams, 1987).

Un'altra più tradizionale classificazione è quella che suddivide i biomateriali in base alle loro caratteristiche chimico-strutturali. Secondo tale classificazione (fig. 1.6) è possibile raggruppare i diversi materiali in cinque categorie: metalli, ceramici, naturali, polimeri sintetici, materiali compositi (Barbucci R. *et al.*, 1994).

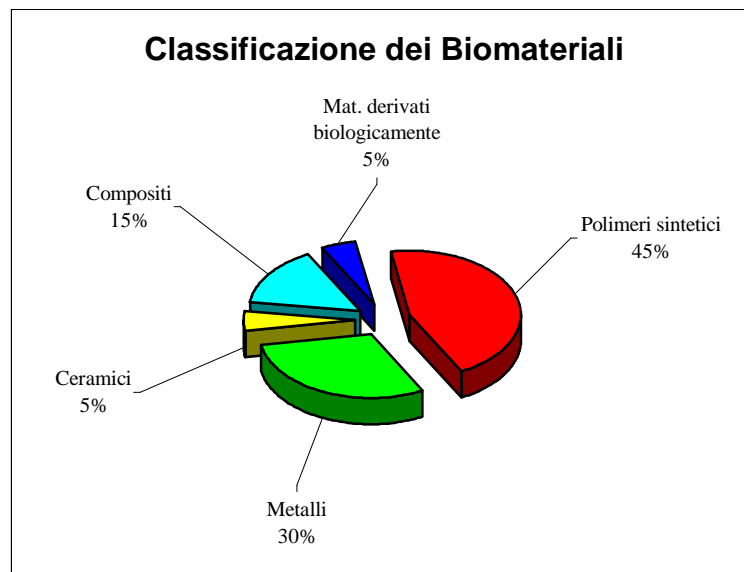


Fig 1.6: classificazione dei biomateriali (Barbucci R. *et al.*, 1994).

Materiali metallici: sono stati i primi materiali usati per la sostituzione di parti del sistema scheletrico. L'acciaio inossidabile (316L SUS), grazie alla sua elevata resistenza alla corrosione, fu il primo materiale impiantabile di natura metallica utilizzato a partire dal 1926 per costruire viti, perni, piastre con cui legare e immobilizzare le ossa.

Il fenomeno della corrosione porta alla liberazione di sostanze che riducono la biocompatibilità di un materiale, come nel caso del cromo cobalto nella sua forma legata che, pur avendo proprietà meno corrosive di altri metalli, è caratterizzato tuttavia da fenomeni di corrosione a lungo termine, con conseguente rilascio di sostanze che ne riducono la sopportabilità nell'ospite. Il suo utilizzo era legato ad impianti di trasmissione del carico e distribuzione dello sforzo a livello dei fianchi e delle giunzioni delle ginocchia.

I coefficienti elastici di questi materiali risultano essere circa 10 volte più grandi di quelli dell'osso naturale, 200 GPa contro 20 GPa; ciò comporta diversi problemi in relazione alla compatibilità meccanica di questi impianti, con fenomeni di atrofia o iperplasia che si verificano dopo l'impianto (Suh H., 1998).

Ai giorni nostri, il titanio (Ti) e la sua forma legata sono i materiali che più frequentemente vengono scelti in diverse applicazioni cliniche, grazie soprattutto alle loro caratteristiche di tollerabilità.

È stato dimostrato che tali materiali, una volta impiantati, legano direttamente il tessuto scheletrico dell'ospite senza indurre una risposta immunitaria. La deposizione sulla superficie di titanio di uno strato ossidato previene attivamente la corrosione causata dai fluidi del corpo e il rilascio di ioni metallici verso i tessuti circostanti.

Dopo l'impianto, gli atomi di ossigeno presenti naturalmente nei liquidi del corpo reagiscono con gli atomi di Ti formando uno strato ossidato di TiO_2 (ossido di titanio); a questo punto l'organismo forma nuovo tessuto osseo mineralizzato e lo deposita direttamente a contatto con la superficie metallica, senza alcuna interposizione. Tale fenomeno è detto osseointegrazione ed indica un diretto contatto biochimico tra il tessuto osseo e la sostanza non naturale (fig. 1.7).

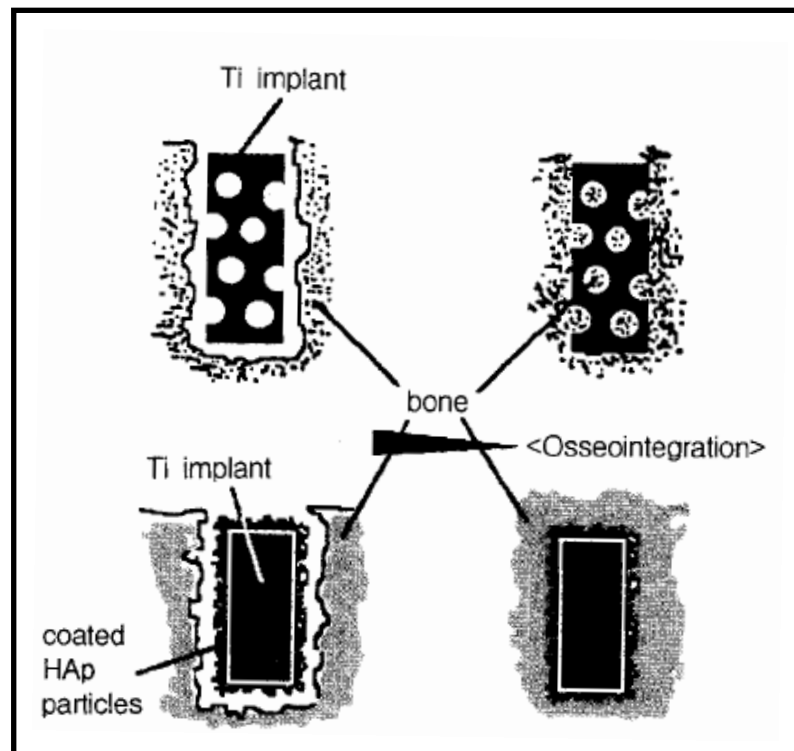


Fig. 1.7: diagramma schematico del processo d'osseointegrazione a livello di un impianto di titanio. Gli osteoblasti proliferano all'interno dei pori dell'impianto e l'osso maturo viene fissato direttamente alla superficie di titanio. Le particelle di idrossiapatite (HAp), poste sulla superficie metallica dell'impianto, vengono chimicamente legate dal tessuto osseo (Suh H., 1998).

Il coefficiente elastico del Ti è meno della metà di quello dell'acciaio inossidabile e della forma legata del cromo cobalto. In questo senso, un impianto di Ti riduce i problemi biomeccanici e, inoltre, la percentuale di fratture dovute al continuo sforzo fisiologico risulta essere molto più bassa rispetto ad impianti fatti con altri noti metalli (Cochran D.L. *et al.*, 1998).

Gli svantaggi relativi all'utilizzo del titanio in campo medico sono da ricercare in alcune caratteristiche intrinseche del metallo in questione. E' noto che il titanio ha una bassa forza di taglio, scarsa resistenza all'abrasione, è difficile da trattare a causa dei movimenti attivi degli atomi, inoltre lo strato ossidato superficiale tende a demolirsi sotto l'azione degli ioni rilasciati dal metallo che inducono fenomeni immunitari, ma la sua tollerabilità resta comunque più alta rispetto ad altri metalli (Suh H., 1998).

Materiali ceramici: sono tutti quei materiali caratterizzati da una struttura in cui le molecole sono regolarmente allineate a formare cristalli minerali. La rete regolare in cui sono disposti gli atomi è alla base della tollerabilità biologica dei ceramici. Non rilasciano ioni e quindi non inducono risposte immunitarie nell'ospite e allo stesso tempo hanno un'elevata compatibilità biomeccanica.

La struttura reticolata limita l'uso di tali materiali a livello delle aree del corpo sottoposte a forze di carico; il regolare allineamento delle molecole rende i ceramici soggetti a facili rotture se sottoposti a piccole forze esterne (Suh H., 1998).

Proprio la fragilità risulta essere la più importante caratteristica fisica dei biomateriali ceramici e per accrescerne la resistenza è necessario effettuare un ri-arrangiamento del reticolo o renderlo mono-cristallizzato.

Negli anni '60 fu introdotto nell'ambito medico l'ossido di alluminio (Al_2O_3), il primo materiale bioceramico. Esso era caratterizzato da una bassa forza tensile e da una elevata fragilità, mentre la sua forma mono-cristallizzata risultava possedere una maggiore forza tensile ed una minore fragilità.

La superficie di un impianto d'ossido di alluminio è ricoperta da un sottile strato d'acqua dovuto all'elevata idrofilicità del materiale. Questo strato gli conferisce una elevata biocompatibilità, oltre a caratteristiche di lubrificazione (Hench L. *et al.*, 1993).

L'idrossiapatite è il materiale ceramico più rappresentativo e viene largamente usato nelle applicazioni cliniche; è ormai noto come i cristalli di apatite, fatti di calcio e fosfato, siano l'elemento minerale principale dell'osso.

Vari composti di idrossiapatite sono stati sintetizzati e commercializzati già a partire dagli anni '70. La superficie dell'idrossiapatite, dopo l'impianto, si lega all'apatite naturalmente presente nelle ossa e tale legame chimico promuove il sistema osso-impianto. Le caratteristiche meccaniche dell'idrossiapatite possono essere modificate

attraverso il controllo della temperatura durante il processo di sintesi e di sinterizzazione. L'idrossiapatite viene solitamente sinterizzata per aumentarne la forza, ma quella sintetizzata al di sotto dei 100°C e sinterizzata a 800°C dimostra una minore forza e subisce una graduale degradazione dopo l'impianto (Bloebaum R.D. *et al.*, 1998).

Oggi giorno l'idrossiapatite viene utilizzata come riempitivo di deficienze ossee o come osso artificiale per rimpiazzare quello naturale qualora non sia impegnato in funzioni di carico fisiologiche (ad es. il setto nasale); inoltre, alcune giunzioni metalliche artificiali vengono ricoperte da idrossiapatite per promuoverne la osseointegrazione (fig. 1.7) (Suh H., 1998).

Materiali naturali: vengono prodotti dagli organismi viventi (animali o piante) e sono tipicamente più complicati chimicamente e strutturalmente rispetto ai sintetici. Le proteine e i polisaccaridi sono esempi di polimeri naturali utilizzati per la creazione di dispositivi medici. I legami altamente direzionali presenti nelle proteine conferiscono elevate proprietà meccaniche, ad esempio la forza tensile della seta è più elevata di quella del nylon, uno dei più resistenti polimeri sintetici; allo stesso modo, il modulo elastico della seta è tredici volte superiore a quello del nylon.

Ci sono materiali ceramici naturali, costituiti principalmente da calcio, come i cristalli ossei di calcio-fosfato, i coralli fatti di carbonato di calcio o le conchiglie marine. I ceramici naturali sono più resistenti alla frattura di quelli sintetici, poiché hanno una microstruttura altamente organizzata

Nella categoria dei materiali naturali rientrano anche tessuti provenienti dagli stessi pazienti (autoinnesti), da donatori (alloinnesti), o da specie differenti come bovini e suini (xenoinnesti).

I materiali naturali hanno una bassa incidenza di tossicità e infiammazione rispetto ai sintetici, ma spesso sono troppo costosi da produrre o isolare. L'isolamento e la purificazione richiedono l'utilizzo di solventi per estrarre i componenti desiderati dal resto del tessuto; ad esempio, il collagene viene isolato con trattamento enzimatico con la pepsina da tessuti naturali come la cresta di gallo. Il collagene fibrillare viene preparato da tessuti naturali come i tendini, attraverso successivi passaggi di estrazione dei sali, dei lipidi e degli acidi per rimuovere le proteine e le molecole non collagenose, lasciando intatte le fibre del collagene.

I biopolimeri possono anche essere prodotti dai batteri. Ad esempio, il poliidrossibutirrato (PHB) viene prodotto attraverso un processo di fermentazione: i batteri producono il polimero in granuli all'interno del loro stesso citoplasma quando vengono alimentati con glucosio e acido propionico nelle giuste proporzioni; le cellule vengono poi distrutte e i granuli lavati e raccolti per centrifugazione e poi asciugati.

I biopolimeri possono inoltre essere prodotti attraverso la polimerizzazione chimica di monomeri naturali: ciò li rende biocompatibili, non tossici e biodegradabili. I polimeri a base di acido lattico sono stati ampiamente utilizzati per molti anni per realizzare diversi dispositivi medici, dalle suture biodegradabili a veri e propri "scaffold" per applicazioni di ingegneria tissutale. L'acido lattico, che è presente naturalmente nel sangue e nei muscoli, viene prodotto commercialmente attraverso la fermentazione batterica di zuccheri come il glucosio. I polimeri dell'acido lattico sono frequentemente utilizzati in combinazione con l'acido poliglicolico (Kuhn L.T., 2005).

Materiali compositi: sono formati da due o più costituenti chimicamente distinti e separati da un'interfaccia. Esempi di materiali compositi con applicazioni biomediche sono il polietilene rinforzato con fibre di carbonio e i polimeri di acido lattico rinforzati con particelle di idrossiapatite, entrambi utilizzati per curare fratture ossee. Molto interessanti sono i materiali compositi realizzati negli ultimi anni: cellule prelevate dalla porzione sana di un tessuto danneggiato possono essere coltivate su supporti sintetici biodegradabili (fig. 1.8 A), in modo da ottenere un biomateriale ibrido; in questo modo, dopo l'impianto, le cellule possono crescere e rigenerare il tessuto, mentre il polimero, che in un primo momento garantisce il supporto alle cellule, successivamente viene lentamente degradato dall'ospite.

Le componenti degradabili più utilizzate sono collagene, acido lattico e polimeri sintetici.

In alcuni tipi di impianti, come nel caso dei vasi sanguigni artificiali, è necessario che la componente sintetica non sia degradabile (fig. 1.8 B).

Il lume del vaso deve essere rivestito da endotelio in modo tale che il sangue che fluisce lungo di esso non venga mai a contatto con la superficie non vitale, causando la formazione di coaguli; in questo modo vengono garantite le proprietà antitrombotiche (Suh H., 1998).

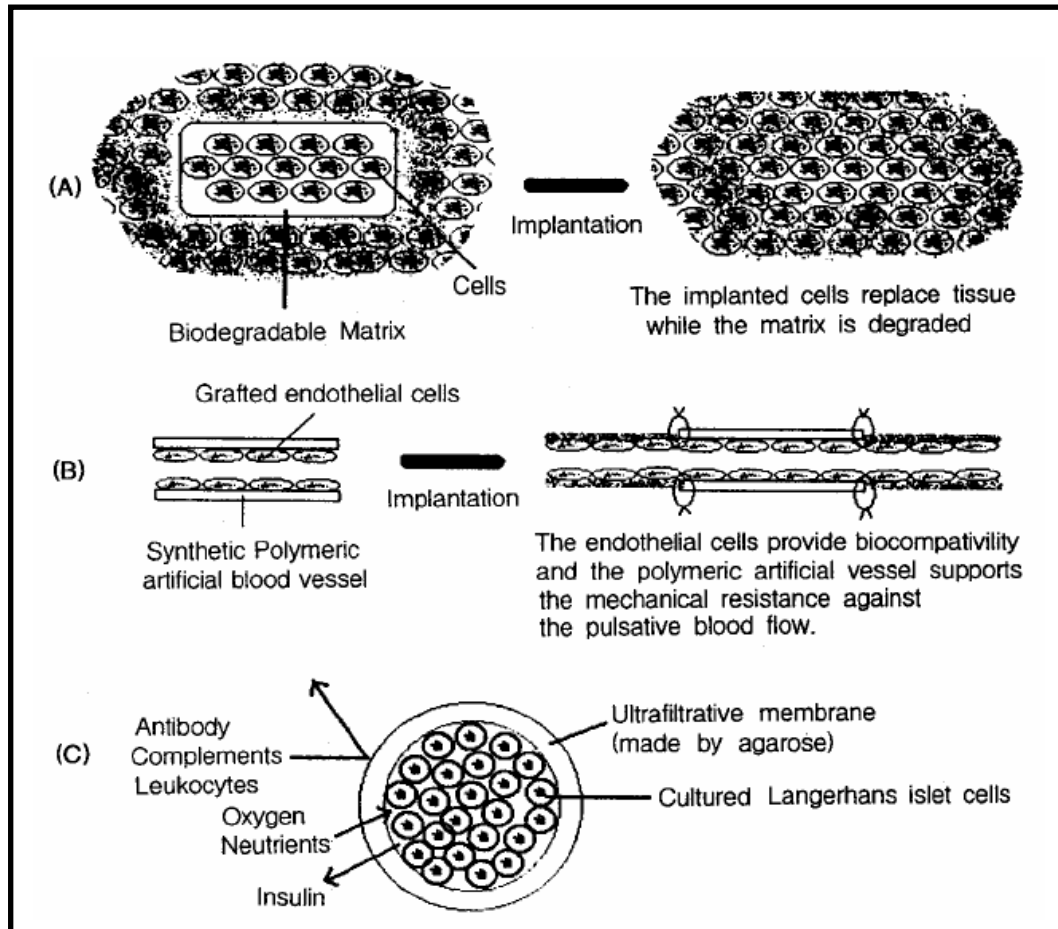


Fig. 1.8: tre diversi tipi di materiali ibridi. (A) le cellule impiantate inducono la rigenerazione del tessuto circostante andando a rimpiazzare la matrice biodegradabile che viene gradualmente riassorbita. (B) le cellule ibridate forniscono le funzioni biochimiche all'impianto, mentre la componente non vitale garantisce il supporto biomeccanico necessario per resistere alla forza pulsante del sangue che scorre. (C) in questo caso la componente acellulare protegge la coltura cellulare da eventuali reazioni immunologiche (Suh H., 1998).

La superficie di supporto all'endotelio deve avere caratteristiche meccaniche tali da resistere alla forza pulsate del sangue fluente, senza subire cedimenti di natura biomeccanica.

Il polimero non deve andare incontro a deterioramento e deve possedere proprietà compatibili con l'organismo ospite; i candidati allo scopo sono il polietilene, il poliuretano e il politetrafluoroetilene (fig. 1.9) (Lanza R.P. *et al.*, 1997).

Le arterie artificiali sono solo un esempio delle applicazioni che i biomateriali compositi possono avere per la cura di determinate deficienze.

Anche se non si è ancora riusciti ad ottenere organi complessi perfettamente funzionanti, le ricerche continuano a dare risultati promettenti.

È il caso del “bioreattore”, un apparato che mima le funzioni del fegato, permettendo la detossificazione temporanea del sangue dei pazienti per almeno due settimane (Suh H., 1998). Il sangue, attraversando le fibre cave della membrana porosa del bioreattore viene filtrato a contatto con gli epatociti che circondano la stessa membrana (Davis M.W. and Vacanti J.P., 1996).

Per la cura dei pazienti affetti da diabete di tipo mellito è stato studiato un biomateriale composito in grado di sostenere un continuo rilascio d’insulina e prevenire eventuali reazioni immunologiche (fig. 1.8 C).

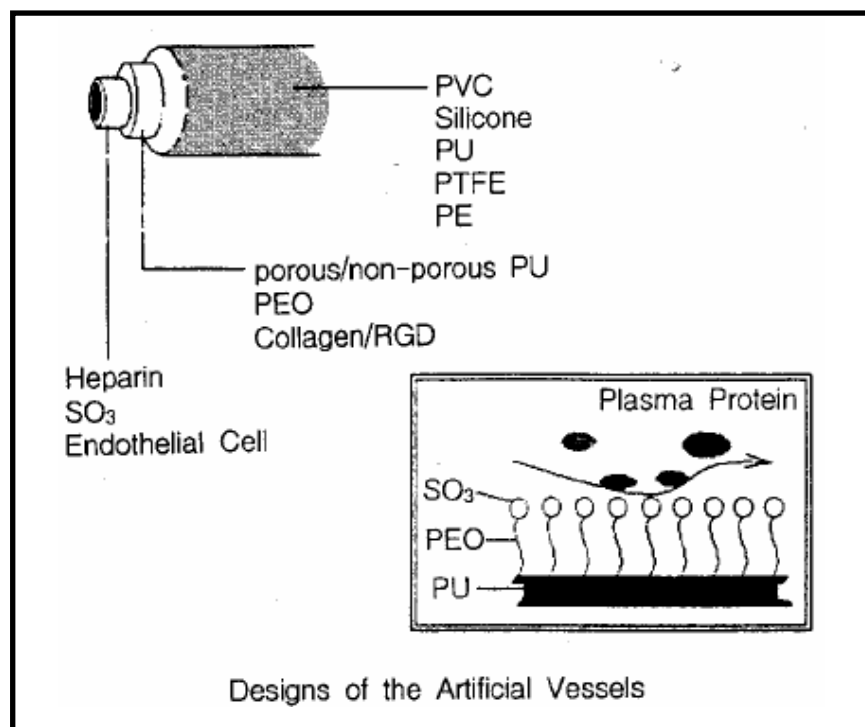


Fig. 1.9: in alto il modello generale di un vaso sanguigno artificiale. Per evitare fenomeni di coagulazione del sangue, il lume interno può essere rivestito da cellule endoteliali ibridate ad un supporto esterno acellulare, eparina (enzima anticoagulante), oppure può essere rivestito da sulfonato (SO₃) legato chimicamente al supporto di PU attraverso un *link* d’ossido polietilene (PEO) (figura in basso) (da Suh H., 1998).

L’idea base è quella di incapsulare cellule eterogenee dell’isola di Langerhans attraverso l’utilizzo di una membrana sintetica semipermeabile, che permetta il continuo e graduale rilascio dell’insulina, ma che al tempo stesso protegga le cellule impiantate dal contatto diretto con gli anticorpi dell’ospite, evitando reazioni immunologiche.

Utilizzando lo stesso principio, nel maggio del 1997, un laboratorio americano ha annunciato la possibilità di incapsulare gli eritrociti attraverso una membrana di polietilenglicole allo scopo di evitare fenomeni di rigetto trasfusionale.

Questo potrebbe aprire le porte a trasfusioni libere, senza tenere in considerazione il gruppo sanguigno del donatore e del ricevente (Suh H., 1998).

Polimeri sintetici: tutti gli organi del corpo, eccetto l'apparato scheletrico, sono costituiti da tessuti molli che garantiscono i regolari processi fisiologici e biochimici. Non esiste un materiale artificiale che possa svolgere le stesse funzioni biologiche di un tessuto naturale, per questo la ricerca di materiali che creino un ambiente favorevole alla rigenerazione di un tessuto o che addirittura ne mimino la funzione è orientata continuamente allo sviluppo di polimeri sintetici.

La scelta dei polimeri sintetici è giustificata dal fatto che, durante la fabbricazione, se ne possono modificare facilmente le proprietà chimiche e meccaniche adattandole alle caratteristiche che il materiale dovrà possedere per svolgere al meglio le funzioni per le quali è stato progettato (Suh H., 1998).

I polimeri si ottengono per polimerizzazione di monomeri dello stesso tipo (omopolimeri) o di monomeri differenti (copolimeri); la polimerizzazione può avvenire per *addizione (chain reaction)*, nella quale i monomeri sono attaccati uno alla volta finché la catena non viene terminata, o per *condensazione (step reaction)*, in cui parecchie catene monomeriche sono addizionate e in cui viene generato un sottoprodotto di reazione come l'acqua (L. T. Kuhn, 2005).

Tra gli "omopolimeri" ricordiamo il polimetil-metacrilato (PMMA), conosciuto commercialmente come Plexiglas[®] o Lucite[®]. Le sue caratteristiche di idrofobicità, trasparenza, resistenza e consistenza vitrea a temperatura ambiente lo rendono adatto per la produzione di lenti intraoculari e lenti a contatto di tipo duro (Suh H., 1998).

Le lenti a contatto morbide, invece, sono fatte di 2-idrossietil metacrilato (HEMA), ottenuto a partire dal PMMA al quale viene aggiunto il gruppo metilene-idrossido (-CH₂OH); per evitare che il polimero si dissolva una volta idratato, il polyHEMA è crosslinkato con etilenglicol dimetilacrilato (EGDM).

Il polietilene (PE), nella sua forma ad alto peso molecolare che non si deforma a temperatura di sterilizzazione, viene utilizzato per la sintesi di cateteri e tubi di drenaggio (Chinn J.A. e Sauter J.A., 1998). Esiste un'ulteriore tipo di PE,

caratterizzato da un peso molecolare ancora più elevato del precedente, che viene impiegato nelle giunzioni artificiali dei fianchi (Suh H., 1998).

Il politetrafluoroetilene (PTFE), comunemente conosciuto come “teflon”, si distingue dal PE per la sostituzione di un idrogeno con un atomo di fluoro. E’ molto stabile sia termicamente che chimicamente e la sua eccellente idrofobicità e capacità di lubrificarsi lo rendono particolarmente adatto per la realizzazione di impianti vascolari; la sua forma microporosa è chiamata Gore-tex (Bujan and Garcia-Honduvilla, 1998).

Il cloruro di polivinile (PVC) nella sua forma pura ha proprietà meccaniche di durezza e fragilità, ma può essere trattato in modo tale da renderlo morbido e flessibile attraverso l’aggiunta di materiale plastificante (Suh H., 1998); solitamente viene utilizzato per la fabbricazione di tubi per le trasfusioni di sangue, flebo e per dialisi.

Il polidimetilsilossano (PMDS) è un polimero piuttosto versatile e data la sua struttura principale di ossido di silicone (SiO_2) è comunemente denominato “silicone”.

Le sue proprietà meccaniche variano in base al peso molecolare, si va dalla fase oleosa alla gomma o alla fase di resina; la sua eccezionale flessibilità e stabilità lo rendono utile per la produzione di giunzioni delle dita, valvole cardiache, protesi mammarie, impianti nasali, protesi dell’orecchio esterno, etc. (Suh H., 1998).

Tra i copolimeri va ricordato il poliglicolattide (PGLA), prodotto attraverso una reazione di apertura dell’anello del glicolide, che, una volta impiantato, subisce una graduale degradazione favorita dalla scissione dei legami esteri presenti nella sua struttura. Viene utilizzato come vite biodegradabile nella fissazione delle ossa: la vite, in un primo momento, serve al mantenimento dell’osso nella giusta posizione per favorire la corretta riunione della frattura, successivamente l’organismo la degraderà gradualmente.

Il poliuretano (PU), invece, è un copolimero contenente una particolare fase avente caratteristiche separate, infatti alterna blocchi duri e morbidi.

I blocchi duri sono composti da diisocianato e agiscono da rinforzo cristallino o semi cristallino nella struttura, mentre i morbidi sono composti da polioli (tipicamente un glicole polietilenico o poliesteri) e danno al PU caratteristiche di gommosità.

I blocchi duri conferiscono caratteristiche di idrofobicità, mentre i morbidi di idrofilicità; tale fenomeno è strettamente connesso all’adesione delle proteine che tendono ad aderire alla superficie idrofobica mentre sfuggono a quella idrofila (Suh

H., 1998). Il poliuretano è un robusto elastomero utilizzato nella ricostruzione di arterie soggette a continue pulsazioni del sangue circolante. La sua caratteristica fase separata previene l'adesione delle cellule del sangue su di essa, escludendo così la formazione di trombi (Kim Y.H. and Park K.D., 1997).

1.3 I polimeri in medicina

Numerosi polimeri, sia naturali che sintetici, vengono attualmente impiegati nella realizzazione di dispositivi medici. I campi in cui essi trovano maggiore applicazione sono il controllo del flusso sanguigno e di altri fluidi corporei (cateteri, cannule, drenaggi, ecc.), le superfici articolari nelle protesi ortopediche, lenti a contatto ed intraoculari, membrane per la somministrazione di farmaci, rivestimenti per sensori e dispositivi elettronici impiantabili, rigenerazione tessutale, riempimento di cavità, valvole cardiache, protesi vascolari, organi bioartificiali (dispositivi medici in cui si ha combinazione di materiali sintetici e di cellule o tessuti viventi).

I principali vantaggi che i polimeri presentano rispetto alle altre classi di materiali sono una maggiore biocompatibilità, la possibilità di modificarne ampiamente composizione e proprietà fisico-meccaniche, bassi coefficienti di attrito, facile processabilità e lavorabilità anche in forme e strutture complesse, possibilità di modificarne chimicamente e/o fisicamente la superficie, possibilità di immobilizzare cellule o biomolecole al loro interno o sulla superficie. Gli svantaggi principali sono la presenza di sostanze che possono essere rilasciate nell'organismo (monomeri, catalizzatori, additivi, ecc.), la facilità di assorbimento di acqua e biomolecole dall'ambiente circostante (anche nelle applicazioni in cui non è richiesto), le basse proprietà meccaniche e, in alcuni casi, la difficoltà di sterilizzazione. Le proprietà finali del dispositivo dipendono sia dalla struttura molecolare intrinseca del polimero che dai processi chimici e fisici a cui è sottoposto e possono essere ampiamente manipolate intervenendo sulle condizioni operative di tali processi e sulla reazione di polimerizzazione.

Nell'ambito di questa ampia classe di biomateriali, ci occuperemo principalmente di due tipologie di polimeri sintetici, gli "hydrogels" conosciuti anche come *synthetic injectable fillers* e utilizzati soprattutto per applicazioni in chirurgia plastica e

ricostruttiva, ed il *poliuretano*, che grazie alla sua eccellente emocompatibilità, viene utilizzato per la realizzazione di dispositivi cardiovascolari.

1.3.1 I fillers

La pelle umana è sottoposta a specifici cambiamenti associati all'invecchiamento. I segni clinici di tale processo includono la comparsa di secchezza, ruvidità, perdita di elasticità, ingiallimento, iper- e ipo-pigmentazione e la tendenza a sviluppare neoplasie pre-maligne o maligne (Coopmann S.A. *et al.*, 1996); questi cambiamenti sono accentuati dal rimodellamento delle ossa e dei muscoli facciali che determinano la formazione di rughe più o meno profonde.

I fattori responsabili dell'invecchiamento cutaneo possono essere suddivisi in esterni e interni. I primi sono strettamente collegati all'ambiente, alle condizioni di vita quotidiane, al tipo di alimentazione, allo stress, a elementi climatici (polveri ambientali) ed all'esposizione alle radiazioni solari (*photoaging*), mentre i secondi sono dipendenti dal patrimonio genetico, dalle caratteristiche chimico fisiche della cute e dalle condizioni del microcircolo cutaneo.

Per venire incontro alle esigenze legate alla cura della pelle, negli ultimi anni sono state introdotte tecniche di *skin-care* meno traumatiche delle tradizionali tecniche di chirurgia estetica, quali *peels* chimici e *laser CO2 resurfacing*, le quali offrono buoni risultati e risultano meno invasive.

Tra queste tecniche trova sempre più spazio l'utilizzo dei *fillers* (Johl S.S. *et al.*, 2006).

I *fillers*, letteralmente "riempitivi", sono materiali impiegati per il trattamento delle rughe, delle cicatrici infossate o per aumentare il volume di alcuni distretti anatomici, come le labbra. Per contrastare il processo d'invecchiamento cutaneo i cosiddetti *dermal fillers* possono, in molti casi, dare una risposta immediata e, se somministrati con regolarità, possono avere una buona durata nel tempo senza creare effetti collaterali.

L'obiettivo è stimolare il derma, migliorandone il *turn-over* cellulare in modo da incrementare la produzione di elastina e collagene che andranno a riempire le aree depresse; inoltre è necessario cercare di ottimizzare l'incremento dell'acido ialuronico e di altri componenti come i glucosaminoglicani. Assieme a ciò è

importante combattere la formazione dei radicali liberi prodotti dal metabolismo cellulare che accentuano l'invecchiamento cutaneo.

Una donna su dieci fra i 30 e i 60 anni fa ricorso a *filler* al fine di attenuare le rughe, aumentare il volume delle labbra, modificare gli zigomi o attenuare la cicatrici introflesse.

Dati rilasciati dalla *American Society of plastic Surgeons* (ASPS) mostrano come nel 2004 si siano avute 1.097.046 procedure d'iniezione di *fillers* e 872.060 nel 2005. Tali valori, in realtà, sono una sottostima in quanto vengono riportate solo le procedure d'iniezione effettuate da membri della ASPS (Johl S.S. *et al.*, 2006).

1.3.2 Composizione della pelle

Un uso razionale dei *fillers* è possibile solo conoscendo il loro *target*, la pelle. Essa consiste di tre strati: l'epidermide, il derma e il grasso sottocutaneo (fig. 1.10).

Lo strato più superficiale della pelle, l'epidermide, svolge il ruolo di barriera contro gli agenti esterni ed è costituito da cellule strettamente impacchettate, sottoposte ad un costante rinnovamento. Tale processo rallenta con l'avanzare degli anni, la pelle tende a rilassarsi e compaiono le rughe.

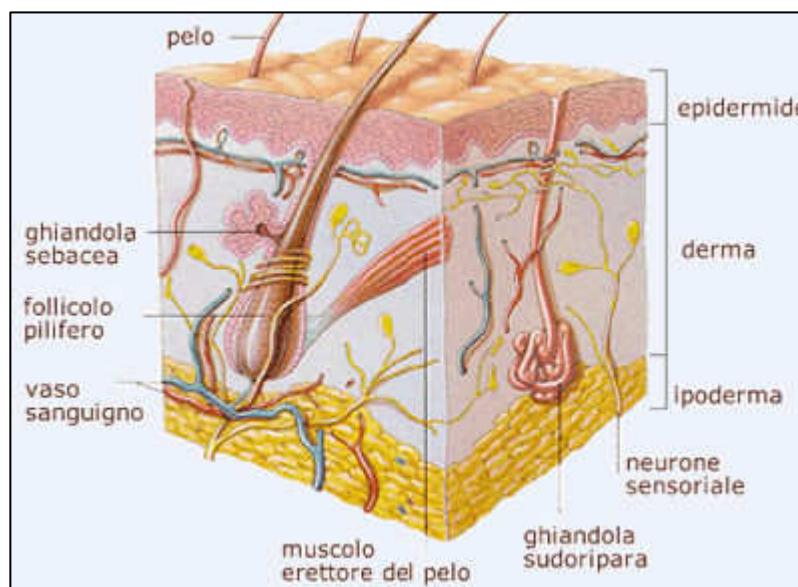


Fig. 1.10: i tre strati di cui è composto l'apparato tegumentario. L'epidermide è un epitelio pavimentoso stratificato cheratinizzato che si trova sopra il derma, una regione di tessuto connettivo che contiene anche ghiandole, follicoli piliferi e recettori sensoriali. Sotto il derma c'è lo strato sottocutaneo che contiene tessuto adiposo e vasi sanguigni.

Sotto all'epidermide troviamo il derma, uno strato per lo più acellulare costituito essenzialmente da una matrice extracellulare di tessuto connettivo comprendente collagene, tessuto elastico e componente amorfa.

Il collagene è l'elemento strutturale principale del derma e si dispone a livello più esterno in modo da formare una fine trama di fibre intrecciate, mentre nello strato più profondo forma spessi fasci (Ardnt K.A. *et al.*, 1996). Ben undici dei 18 tipi di collagene conosciuti sono stati trovati nella pelle umana (Baumann L. *et al.*, 2004).

Il collagene di tipo I rappresenta l'80% di quello presente nella pelle umana e fornisce alla pelle forza tensile (Ardnt K.A. *et al.*, 1996); quello di tipo III rappresenta il 15% del collagene totale, è stato trovato al di sotto della membrana basale dell'epidermide e ha la funzione di ancorare l'epidermide al derma (Uitto J *et al.*, 1996). Le fibre elastiche costituiscono il 3% del peso secco del derma, giocano un ruolo importante nel dare elasticità e resilienza alla pelle. La componente amorfa riempie gli spazi tra la componente fibrillare e quella cellulare del derma; dona turgidità alla pelle ed è composta da mucopolisaccaridi, proteine plasmatiche, elettroliti e acqua. I mucopolisaccaridi sono costituiti da glicosaminoglicani e acido uronico; nel derma i più comuni glicosaminoglicani sono l'acido ialuronico e il dermatan solfato. Questa struttura chimica altamente complessa è in grado di assorbire acqua per un massimo di 1000 volte il suo volume (Uitto J. *et al.*, 1996).

I fillers possono essere inseriti nel derma superficiale (*fillers superficiali*), andando così a correggere le rughe meno profonde, oppure possono essere iniettati nel derma profondo o nel tessuto sottocutaneo (*fillers profondi*), per correggere le depressioni, gli svuotamenti o i veri e propri solchi della pelle.

L'ultimo strato è costituito da tessuto adiposo che dà volume alla pelle. L'invecchiamento riduce la quantità di tale tessuto provocando la comparsa di ulteriori inestetismi (Johl S.S. *et al.*, 2006).

1.3.3 Classificazione dei fillers

Sebbene ne esistano in commercio una notevole varietà, ognuno di essi presenta pregi e difetti specifici. I *fillers* iniettabili attualmente disponibili permettono correzioni più o meno efficaci, ma presentano anche numerosi inconvenienti. Tutti i *fillers* vengono iniettati localmente nell'area da trattare e la maggior parte di essi

permette di ottenere solo un effetto limitato nel tempo, di durata variabile e dipendente dal tipo di sostanza utilizzata.

Sono varie le classificazioni dei *fillers* che si possono trovare in letteratura. Alcune si basano sulla durata dell'impianto, per cui distinguiamo:

- *filler* di tipo riassorbibile;
- *filler* semi permanenti;
- *filler* permanenti.

I fillers riassorbibili hanno il pregio di essere facilmente tollerati dall'organismo, ma danno un aumento di volume temporaneo (da 4 a 6 mesi). I materiali riassorbibili sono essenzialmente due: il collagene e l'acido ialuronico. Queste sostanze sono proteine naturalmente presenti nella nostra cute e costituiscono la componente strutturale principale dei tessuti connettivi. Una volta iniettati, il collagene e l'acido ialuronico vengono progressivamente metabolizzati e quindi riassorbiti con tempi che variano da poche settimane a 6 mesi. I tempi di riassorbimento dipendono dal volume delle particelle e dai legami intermolecolari che le case farmaceutiche riescono a sintetizzare. I prodotti commerciali più comuni contenenti acido ialuronico sono: "Restylane", "Perlane", "Juvederm", "Hylaform", "Vital", "Restylane subQ", mentre quelli contenenti collagene sono: "Zyderm" e "Zyplast" (entrambi di origine bovina), "Cosmoderm" e "Cosmoplast" (più recenti e più sicuri perché non di origine animale).

I fillers semipermanenti hanno il pregio di dare un risultato estetico più duraturo (dai 12 ai 36 mesi, a volte anche anni), ma generalmente non sono ben tollerati dall'organismo. I materiali semipermanenti sono essenzialmente tre: l'acido polilattico, il collagene associato al polimetilmetacrilato oppure l'acido ialuronico associato ad un idrogel acrilico.

I materiali semipermanenti sono costituiti da una componente riassorbibile nel giro di alcuni mesi e da una minima componente permanente. I prodotti commerciali più comuni sono: "New fill" o "Sculptra", "Artecoll", "Dermalive" e "Reviderm intra".

I fillers permanenti hanno il pregio di dare un risultato estetico definitivo ma talvolta possono provocare una reazione di rigetto non prevedibile e difficilmente

controllabile e correggibile. Derivano da polimeri con legami alchil-ammidici e poliacrilamide e sono costituiti da molecole non riassorbibili. Il silicone in forma di gel iniettabile è un filler permanente il cui uso è stato vietato dalla legge italiana agli inizi degli anni '90 per i numerosi effetti collaterali cui può dare adito. Attualmente i prodotti più comuni ammessi in commercio sono: "Bioalcamid" e "Aquamid".

Un'altra classificazione viene fatta in base alla loro origine:

- *filler* eterologhi;
- *filler* omologhi;
- *filler* autologhi;
- *filler* di sintesi.

Una terza classificazione è quella che distingue i fillers in:

- *filler* naturali;
- *filler* sintetici.

In questo lavoro di tesi prenderemo in considerazione questa ultima classificazione per analizzare uno per uno i diversi fillers attualmente disponibili sul mercato.

1.3.4 Fillers naturali

Collagene

Come abbiamo detto in precedenza, è un componente strutturale della pelle la cui quantità decresce e le cui caratteristiche si modificano con l'avanzare del tempo (il rapporto tra il tipo I e il III si abbassa) (Ardnt K.A. *et al.*, 1996). L'esposizione a sole, tabacco e inquinamento aumentano i livelli di collagenasi con una conseguente accelerazione dei processi d'invecchiamento (Baumann L. *et al.*, 2004).

L'utilizzo di *fillers* a base di collagene sembra essere il modo migliore per rimpiazzare il collagene endogeno che viene perso con l'avanzare degli anni.

Il **collagene bovino** fu il capostipite dei *fillers* iniettabili di natura eterologa ed in particolare la sua prima versione commerciale, lo *Zyderm*, fu approvato nel 1981 dalla FDA americana per il trattamento delle rughe e dei solchi profondi.

Purtroppo, il collagene bovino dopo l'infiltrazione viene immediatamente riconosciuto dal sistema immunitario come sostanza estranea all'organismo ed eliminato in 2-3 mesi circa. Molti studi hanno infatti dimostrato la completa scomparsa del collagene a distanza di 3 mesi dal trattamento, con la conseguente necessità di ripetere le infiltrazioni per mantenere un risultato soddisfacente.

Ecco perché qualche anno dopo, la INAMED Aesthetics di Santa Barbara, L.A. (U.S.A.), già produttrice dello *Zyderm*, propose sul mercato una nuova formulazione, lo *Zyplast*.

Lo *Zyplast* è stato sviluppato per fornire effetti più duraturi dello *Zyderm*; infatti, le fibre di collagene di cui è composto sono state *crosslinked* con glutaraldeide in modo tale da inibirne la degradazione per opera della collagenasi (Baumann L. *et al.*, 2004).

Nel 1985, la U.S. FDA approvò l'uso di questo nuovo prodotto basato su collagene bovino. Il collagene in entrambi i casi deriva da pelle di bovino isolata da mandrie selezionate americane (Murray C.A. *et al.*, 2006).

Lo *Zyderm* è disponibile in due versioni: lo *Zyderm I*, costituito per il 3,5% del suo peso totale da collagene (35 mg/ml in PSB con 0,3% di lidocaina) e lo *Zyderm II*, costituito per il 6,5% da collagene (65 mg/ml).

L'introduzione di lidocaina in tali impianti diminuisce la sensazione dolorosa dovuta all'iniezione; inoltre sembra che inibisca l'attivazione degli eosinofili, i quali giocano un ruolo cruciale nella formazione di lividi ed edema (Baumann L. *et al.*, 2004).

Lo *Zyderm I* è utilizzato per iniezioni superficiali, lo *Zyderm II* per quelle nel derma medio-profondo, mentre lo *Zyplast* per impianti nel derma profondo (Murray C.A. *et al.*, 2005).

Il collagene bovino, una volta iniettato, viene riconosciuto come materiale estraneo dall'organismo, che attiva sistemi di difesa immunitaria allo scopo di eliminarlo. Si attiva la produzione di collagenasi e si espleta una risposta infiammatoria che spesso comporta formazione di edema con un conseguente aumento del volume dell'area soggetta all'impianto. Per questi motivi è necessario effettuare un test allergologico attraverso una piccola inoculazione sottocutanea, prima di effettuare il trattamento.

È stato stimato che il 3-5% della popolazione mostra una ritardata ipersensibilità al prodotto (Owens J.M. *et al.*, 2005).

Molti raccomandano un'ulteriore test allergologico poche settimane dopo il primo, a causa di un possibile evento di sensibilizzazione che colpisce l'1-2% della popolazione (fig. 1.11) (Glavas I.P., 2005).



Fig. 1.11: formazione di noduli in risposta all'ipersensibilità al trattamento con *Zyplast*; nonostante i test allergologici avessero dato risultato negativo (Matarasso S.L. *et al.*, 2006).

Numerosi test hanno mostrato come la risposta immunitaria contro il collagene bovino si sviluppi in tutti i pazienti sottoposti all'iniezione, anche se la severità varia da persona a persona. È anche possibile una ipersensibilizzazione al prodotto nella successiva ripetizione dell'iniezione (Owens J.M. *et al.*, 2005).

Per ovviare ai problemi derivanti dal collagene bovino, la INAMED Aesthetics propose due nuove formulazioni di *filler* basate su **collagene umano**, *Cosmoderm* e *Cosmoplast*.

Le due nuove formulazioni sono state approvate nel 2003 dalla FDA americana per il trattamento delle rughe d'espressione, di cicatrici dovute all'acne e per il rimodellamento delle labbra.

I prodotti sopraccitati contengono collagene purificato da linee cellulari di fibroblasti umani (Glavas I.P., 2005), inoltre sono opportunamente trattati in modo da rendere il materiale libero da cellule del sistema immunitario e melanociti (Baumann L. *et al.*, 2004).

L'origine endogena del collagene rende inutili test allergologici preventivi. Come lo *Zyderm* e lo *Zyplast*, il *Cosmoderm* e il *Cosmoplast* vengono pre-impaccati in siringhe che contengono lo 0,3% di lidocaina come anestetico locale. Il *Cosmoplast*,

come lo *Zyplast*, contiene fibrille di collagene *crosslinked* con glutaraldeide per aumentarne la durata dopo l'impianto.

L'utilizzo del collagene umano appare più semplice di quello bovino, con un'iniezione più scorrevole e una sensibile diminuzione della formazione di grumi (Baumann L. *et al.*, 2004).

Accanto a queste formulazioni troviamo prodotti quali *Isolagen*, *Alloderm* e *Dermalogen*.

L'*Isolagen* è collagene umano derivato da colture cellulari di fibroblasti isolati dalla pelle del paziente al quale verrà effettuata l'iniezione. Questa formulazione senza dubbio evita risposte allergiche ma risulta essere piuttosto costosa.

L'*Alloderm* e il *Dermalogel*, così come l'*Isolagen*, sono prodotti dalla *Woodlands* (Texas).

Il primo è costituito da derma umano trattato, proveniente da cute di donatore. Il trattamento biochimico rende l'*Alloderm* completamente acellulare e sterile, rimuovendo tutti i possibili antigeni potenzialmente responsabili di reazioni allergiche. Trattandosi non di una vera sostanza iniettabile ma di una vera sezione di derma umano, l'*Alloderm* trova indicazione soltanto nel trattamento dei solchi nasolabiali e nell'incremento del volume delle labbra. Ha, inoltre, un'ottima biocompatibilità ed è molto efficace nel correggere le imperfezioni cutanee, ma è molto costoso e di difficile conservazione.

Il *Dermalogel* è un nuovo preparato iniettabile a base di collagene, elastina e glicosamminoglicani provenienti da donatore umano. Per quanto molto simile al collagene bovino nell'impiego e nelle indicazioni, è privo dei rischi di complicanze allergiche e pare, in base agli studi disponibili, di essere in grado di garantire una durata maggiore. Il processo di produzione prevede due fasi: una di inattivazione dei virus ed una dei prioni, più un'ultima fase di sterilizzazione.

La FDA statunitense ne ha approvato il pieno utilizzo, tuttavia in Italia non è ancora diffuso nella pratica clinica.

Cymetra (LifeCell Corporation, Palo Alto, California), approvato nel 2000 dalla U.S. FDA, rappresenta la forma iniettabile dell'*Alloderm* (Sclafani A.P. *et al.*, 2002). Esso deriva da tessuto di donatore opportunamente trattato: il primo step prevede la rimozione dell'epidermide, seguita dall'eliminazione delle cellule del derma e dalla stabilizzazione della matrice attraverso l'inibizione delle metalloproteinasi; il materiale ottenuto viene poi criofratturato in particelle che vengono impaccettate

nelle siringhe, rendendo necessario idratare la polvere al momento dell'uso. Pur non scatenando alcuna risposta immunitaria (le cellule del complesso maggiore di istocompatibilità I e II sono state rimosse), presenta lo svantaggio di essere costituito da particelle di grandi dimensioni (>100 µm), per cui le iniezioni sono dolorose per il paziente. Dunque, le dimensioni delle particelle idratate e degli stessi aghi non permettono di effettuare iniezioni intradermiche; non ci sono studi clinici che dimostrino che la sua durata è maggiore rispetto ad altri impianti di collagene (Barry L.E. *et al.*, 2005).

Acido ialuronico

È la componente più abbondante della matrice di tessuto connettivo che si trova nel derma. Forma la matrice fluida elasto-viscosa in cui le fibre di collagene ed elastina sono immerse (Baumann L. *et al.*, 1996). A differenza del collagene, la sua struttura chimica appare conservata tra le diverse specie viventi, abbassando così la sua immunogenicità.

La natura idrofila dell'acido ialuronico (HA) richiama e trattiene l'acqua all'interno dello spazio extracellulare, determinando un aumento del volume del derma e una maggiore compattezza. La pelle invecchiata mostra un livello più basso di HA rispetto alla pelle giovane, con il risultato di una perdita di idratazione del tessuto; questo potrebbe spiegare la successiva disorganizzazione delle fibre di collagene ed elastina che caratterizza la pelle invecchiata (Baumann L. *et al.*, 1996).

Tra i *fillers* naturali, l'acido ialuronico è in grado di riorganizzare e di integrare la matrice extracellulare, dando maggiore compattezza e turgore al tessuto. Interagendo con i fibroblasti, stimola la produzione di nuovo collagene, elastina e acido ialuronico endogeno e contrasta i radicali liberi.

L'utilizzo di HA come *dermal filler* nella sua forma naturale comporta nella zona d'iniezione una rapida degradazione (1-2 giorni) e una successiva trasformazione di questo in acqua e CO₂ a livello del fegato (Murray C.A. *et al.*, 2005); per aumentarne la permanenza lo si rende più stabile attraverso un processo di *crosslinking*.

L'HA *crosslinked* prende il nome di *hyalans* o acido ialuronico gelificato; esso viene rigonfiato d'acqua per il 95% del suo peso ed ha caratteristiche uniche di viscosità dinamica, infatti la sua viscosità decresce all'aumentare delle forze di taglio (Narins

R.S. *et al.*, 2005). Sotto la pressione dell'iniezione (forte forza di taglio), il gel passa facilmente attraverso il fine ago della siringa in quanto la viscosità decresce; nel momento in cui l'iniezione è terminata e con essa cessa la forza di taglio, il *filler* acquista viscosità e difficilmente migra al di fuori del sito d'impianto.

Un'altra caratteristica che rende unico l'HA è la cosiddetta degradazione isovolumetrica (Narins R.S. *et al.*, 2005); in altre parole, sebbene alcune molecole di HA vadano incontro a degradazione, quelle restanti sono in grado di assorbire ancora più acqua in modo da mantenere inalterato il volume del gel.

Clinicamente è dimostrato che l'impianto tende a mantenere più del 95% del suo volume iniziale sino a che non viene riassorbito del tutto (Narins R.S. *et al.*, 2005).

Sono quattro le formulazioni di *fillers* basati su HA ad essere state approvate dalla U.S. Food and Drug Administration (FDA). Per ognuna di esse è stato approvato l'impianto sia nel derma superficiale che nel profondo, allo scopo di correggere tutti i tipi di rughe facciali, dalle moderate alle più severe, e i solchi come quelli nasolabiali. Inoltre vengono utilizzate per il rimodellamento delle labbra o per il loro aumento, per le cicatrici infossate, per le malformazioni congenite o traumatiche (Johl S.S. *et al.*, 2006).

Il *Restylane* (Q-Medical, Uppsala, Svezia), approvato dalla FDA americana nel dicembre 2003, è prodotto da colture di *Streptococcus equi*.

L'acido ialuronico così ottenuto viene chimicamente stabilizzato attraverso *crosslinking* permanenti con epossidi. I bassi livelli di impurità, l'alta concentrazione di HA e una minima percentuale di *crosslinking* (1%) aiutano il *Restylane* ad avere una alta biocompatibilità (Matarasso S.L. *et al.*, 2006).

La formulazione di *Restylane* approvata dalla FDA statunitense ha concentrazione di HA di 20 mg/ml e dimensione delle particelle di gel di 400 µm. Sono state, invece, scartate altre due formulazioni che presentavano la stessa concentrazione di HA (20 mg/ml) ma dimensioni delle particelle del gel differenti. Si tratta del *Restylane Fine Lines*, indicato per impianti molto superficiali, avente dimensioni delle particelle più piccole di 400 µm e il *Restylane Perlane*, indicato per impianti profondi, ma avente particelle di dimensioni più grandi di 400 µm (fig. 1.12) (Narins N.S. *et al.*, 2006).

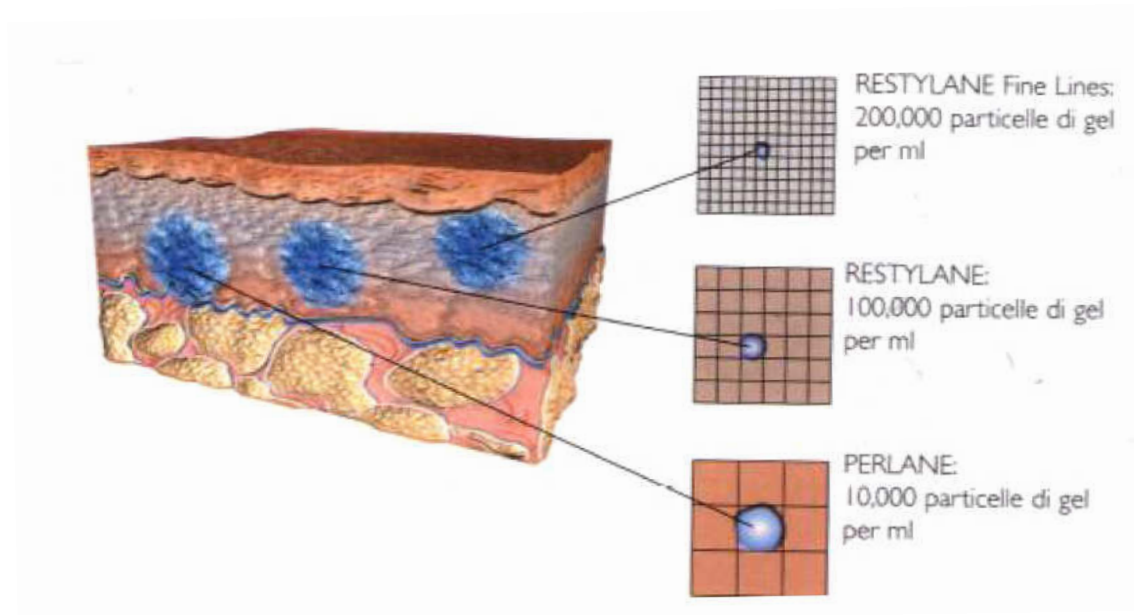


Fig. 1.12: le tre diverse formulazioni di Restylane e le loro diverse sedi d'applicazione nel derma (da Scimè I., 2003).

Bisogna ricordare come la viscosità, caratteristica che rende unico l'HA, è direttamente proporzionale con le dimensioni delle particelle del gel, per cui dimensioni troppo grandi potrebbero risultare inadeguate all'impianto (Glavas I.P., 2005).

Un'altra formulazione approvata dalla FDA americana nell'aprile del 2004 è l'*Hylaform* (INAMED Aesthetics). È acido ialuronico purificato, ottenuto da creste di gallo e chimicamente *crosslinked* con divinil sulfone (Narins N.S. *et al.*, 2005). Contiene una piccola quantità di proteine aviarie, una concentrazione di HA di 5 mg/ml con una percentuale di *crosslinking* del 20%.

La percentuale elevata di *crosslinking* che caratterizza l'*Hylaform* potrebbe ridurre la biocompatibilità una volta nel derma, inoltre la minore concentrazione di HA rispetto a quella del *Restylane* comporta una minore durata dell'impianto (Rao J. *et al.*, 2005).

Esistono tre formulazioni che si differenziano per le dimensioni delle particelle: *Hylaform finelines* ha particelle molto piccole (300 μm) ed è usato per il trattamento delle rughe periorbitali; *Hylaform regular*, con particelle di 500 μm , è l'ideale per trattare le rughe periorali e di espressione; *Hylaform plus*, con particelle di 750 μm , è indicato per il trattamento dei profondi solchi naso-labiali (Hotta T., 2004).

Il *Captique* (INAMED Aesthetics), come il *Restylane*, è un'altra formulazione di HA di origine non animale, ottenuto dalla fermentazione batterica. Al contrario del *Restylane*, ha una concentrazione di HA inferiore, 5 mg/ml, e una percentuale di crosslinking maggiore, 20% (John S.S. *et al.*, 2006).

L'ultimo prodotto della INAMED Aesthetic a base di HA, approvato dalla FDA americana, è lo *Juvederm*. Anch'esso è di derivazione batterica, ma differisce dagli altri prodotti perché è un gel omogeneo, privo di particelle e altamente purificato; ciò aumenta potenzialmente la biocompatibilità e la durata dell'impianto (Baumann L. *et al.*, 2004). Le catene di HA dello *Juvederm* sono chimicamente stabilizzate mediante reticolazione con 1,4-butanediol-diglicidil-etero(BDDE).

Gli effetti degli HA-*fillers* potrebbero perdersi dopo circa 9 mesi dall'impianto. Prove cliniche con il *Restylane* hanno dimostrato come, nei casi in cui l'iniezione abbia completamente corretto il difetto, più dei due terzi della correzione permane per 6-8 mesi dopo il trattamento (Matarasso S.L. *et al.*, 2006).

La successiva iniezione nei pazienti precedentemente trattati richiede una quantità di *Restylane* inferiore per garantire il mantenimento dell'effetto estetico.

Comparando le differenti preparazioni di HA, risulta evidente come il *Restylane* sia più viscoso e meno elastico rispetto all'*Hylaform* e questo potrebbe essere la causa di un aumento delle infiammazioni locali nella sede dell'impianto (fig. 1.13) (Murray C.A. *et al.*, 2005).

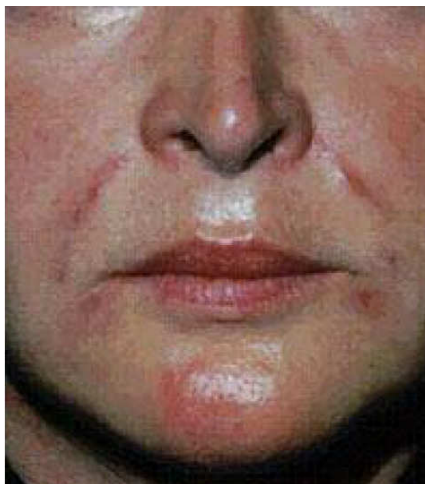


Fig. 1.13: la paziente presenta una risposta infiammatoria dopo trattamento con acido ialuronico (da Scimè I., 2003).

Grasso autogeno

Lipofilling

I primi impianti di tessuto adiposo descritti negli anni '80 hanno dimostrato come la microiniezione di tessuto adiposo sia una tecnica efficace per la correzione delle depressioni cutanee. I difetti principali di questa tecnica sono costituiti dalla necessità di un intervento di prelievo del grasso (una piccola liposuzione) e dalla necessità di ripetere il trattamento più volte, fino ad ottenere la correzione desiderata. Purtroppo, solo pochi casi ottengono un risultato stabile nel tempo poiché, come si vede da indagini istologiche, gli adipociti che sopravvivono sono molto pochi. Gli adipociti sono, infatti, cellule molto fragili che, al di fuori dall'organismo, hanno vita molto breve, inoltre non tollerano le manipolazioni eccessive e sono molto sensibili alle infezioni.

La tecnica si basa sull'estrazione del grasso mediante aspirazione prevalentemente in regione trocanterica e/o addominale. Quando il grasso viene estratto, lo si lascia decantare in siringa formando tre strati visibilmente distinguibili: uno strato superiore, costituito essenzialmente da tri-gliceridi, uno intermedio, costituito da adipociti e uno più profondo, costituito da sangue e fluidi.

Il grasso da usare va quindi ripulito dal sangue e dai tri-gliceridi e immediatamente iniettato nelle aree depresse. Si possono iniettare solo piccole quantità di grasso poiché i grossi frammenti tendono a dare necrosi centrale. Il tessuto adiposo prelevato va manipolato il meno possibile e va iniettato in tessuto sano (Scimè I., 2003).

In alcuni casi la durata dell'impianto può essere comparata a quella del collagene bovino a causa del riassorbimento, in altri casi l'effetto estetico può durare anche più di 7 anni (Murray C.A. *et al.*, 2005), come nel caso del trattamento dei solchi nasolabiali.

Negli ultimi anni questa metodica è stata sostituita dalla nuova tecnica di lipostruttura secondo "Coleman".

Lipostruttura

La lipostruttura è una tecnica che si è evoluta dal *lipofilling*, attraverso la modifica e il perfezionamento di tutte le fasi del trattamento.

Il prelievo del grasso viene effettuato in anestesia locale con una microcannula (disegnata da Coleman) collegata ad una siringa, al fine di aspirare grasso ancora vitale e ideale per il trapianto. Dopo il prelievo, il grasso nella siringa viene fatto sedimentare e poi centrifugare per ottenere grasso puro, scartando i tri-gliceridi e il sangue.

L'iniezione viene effettuata con siringhe molto piccole (1ml) collegate ad una cannula sottilissima (1,5 mm), che consente di controllare meglio le piccole quantità di grasso che vengono depositate nella zona ricevente.

Il grasso viene depositato prevalentemente in sede intramuscolare, in modo da creare un aumento strutturale della zona e favorire il massimo attecchimento. Con le tecniche di *lipofilling* tradizionali il grasso non viene centrifugato e la tecnica di deposito prevede meno passaggi e una distribuzione non strutturale nei tessuti riceventi.

Il problema maggiore nel trapianto di grasso è la sua sopravvivenza. Con la lipostruttura il grasso viene manipolato con molta attenzione e depositato in piccole quantità nei tessuti riceventi.

Questa stratificazione crea un'ampia superficie di contatto tra i tessuti e garantisce un'ottima nutrizione delle cellule di grasso trapiantate. Ciò è fondamentale per permettere al grasso di sopravvivere prima che si formino nuovi vasi sanguigni che lo nutriranno adeguatamente.

Tutte le zone del viso possono essere sottoposte all'innesto di grasso autologo: gli zigomi, il solco naso-giugale situato sotto la palpebra, il cui riempimento produce la scomparsa o l'attenuazione delle occhiaie, i solchi naso-labiali che col passare del tempo si svuotano, le labbra, che con l'innesto di grasso ottengono una forma naturale, le atrofie facciali come nella sindrome di Parry Romberg o nei pazienti HIV positivi.

Le complicanze possibili sono quelle legate a tutti gli interventi chirurgici: ematomi, infezioni, edema persistente, macchie cutanee (Scimè I., 2003).

1.3.5 Fillers sintetici

Olio di silicone

Con il termine “silicone” si fa riferimento ad una serie di polimeri di sintesi contenenti per l'appunto silicone, il settimo elemento più abbondante nell'universo e addirittura il secondo nella crosta terrestre. Il silicone può esistere in forma solida (elastomeri), di gel, di schiuma e liquido, in relazione al grado di polimerizzazione.

Il silicone liquido è stato utilizzato per l'aumento dei tessuti molli per almeno 40 anni in tutto il mondo e si stima che, solo in USA, almeno 200000 pazienti siano stati trattati con questo filler sintetico (Duffy D.M., 2005).

L'uso del silicone liquido per infiltrazione (olio di silicone o olio silossanico) è stato abolito nel 1991 dalla FDA americana che ne ha proibito l'utilizzo per qualsiasi uso estetico, determinandone così la quasi scomparsa dal mercato sanitario.

Tuttavia, l'introduzione di un nuovo prodotto a base di silicone liquido, approvato per il solo uso oculistico (trattamento del distacco della retina), consente oggi di disporre di silicone di grado medico, che viene a volte usato anche per finalità cosmetiche, in contrasto con le disposizioni in atto. Esistono tre diverse qualità di silicone:

- Medico, non più disponibile sul mercato;
- Oftalmico, approvato per l'uso sull'uomo, limitatamente al distacco della retina (si tratta del *Silikon*, AlconLabs, Fort worth, Texas, U.S.A. e dell'*AdatoSil*, Baush and Lomb, Claremont, California, U.S.A. (Johl *et al.*, 2006);
- Industriale, per uso tecnico non idoneo all'uso nell'uomo.

Il silicone, così come tutte le sostanze chimiche non metabolizzabili dal nostro organismo, quando viene introdotto nel corpo attiva un processo di granulazione che ingloba il materiale estraneo. L'entità volumetrica del granuloma può variare da soggetto a soggetto e non può essere programmabile, pertanto in caso di introduzioni di grandi volumi ne consegue la possibilità di un'iper-correzione che può essere corretta solo chirurgicamente.

Il silicone che si usava comunemente un tempo era un silicone molto purificato che veniva iniettato in piani molto profondi (ipodermico o sopra fasciale) per limitare i danni di una eventuale risposta fibrotica esagerata; tuttavia, l'introduzione su piani

profondi portava a due conseguenze: la prima era che, per correggere una piccola ruga, si doveva introdurre una grande quantità di sostanza, la seconda, conseguente alla prima, era che il prodotto infiltrato in grande quantità poteva migrare, scivolando lungo la fascia muscolare in distretti diversi da quelli inizialmente trattati. Tutto questo ha portato a sconsigliarne l'uso da parte del mondo scientifico ufficiale.

Per ciò che concerne la possibilità che possa indurre la comparsa di una neoplasia maligna, non esiste nessuna letteratura scientifica che colleghi il silicone al cancro. Quando il silicone viene iniettato in grandi quantità nel tessuto adiposo, può determinare la comparsa di masse pseudo tumorali definite "siliconomi". Questo ne ha determinato la sospensione da parte del Ministero della Sanità. La stessa FDA americana non condanna l'uso di questa sostanza, ma non esprime parere perché non giudica sufficienti le sperimentazioni attuali. Attualmente l'olio silossanico è usato in molti paesi del Sud America e in molti paesi dell'Est europeo per il trattamento delle pieghe nasolabiali, per il riempimento delle rughe del volto e per l'incremento del volume delle labbra (Scimè I., 2003).

Particelle di acido polilattico

L'acido polilattico è un polimero sintetico appartenente alla famiglia degli α -idrossiacidi. E' un materiale biocompatibile e immunologicamente inerte ed è stato a lungo tempo impiegato per usi medici diversi (placche per fissaggio osseo, suture assorbibili e sistemi impiantabili di rilascio controllato dei farmaci).

Sculptra (Dermik Laboratories, Berwyn, Pennsylvania, U.S.A.) è la sua forma iniettabile. Questa formulazione è stata approvata nell'agosto del 2004 dalla FDA americana per la correzione dei segni di lipoatrofia facciale associata ad infezione da HIV (Johl S.S. *et al.*, 2006).

Fuori dagli Stati Uniti d'America, *Sculptra*, veniva già usato come *filler* dal 1999 sotto il nome commerciale di *New-Fill*.

Le microparticelle d'acido polilattico in *Sculptra* hanno un diametro di 40-63 μm e sono sospese in un gel di carbossimetilcellulosa di sodio; queste particolari dimensioni permettono di evitare la fagocitosi da parte dei macrofagi del derma e ne impediscono il passaggio attraverso i vasi capillari (Vleggaar D., 2005).

Può essere iniettato nel tessuto sottocutaneo o nel derma profondo; dopo l'impianto le microsfere d'acido polilattico vengono degradate gradualmente e alla fine metabolizzate in CO₂ e acqua. Durante questo processo viene prodotto collagene, che garantisce una correzione del volume a lungo termine, con un graduale aumento dell'area depressa già nei primi mesi dopo l'iniezione (Vlegaar D., 2005). Per questo motivo è necessario evitare la completa correzione dell'inetetismo durante l'iniezione, specialmente durante il primo trattamento (fig. 1.14).

L'effetto estetico potrebbe perdersi tra i 18 e i 24 mesi dall'iniezione dell'impianto.

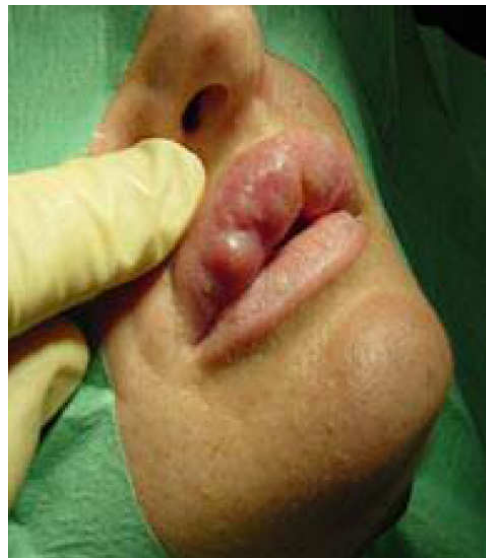


Fig. 1.14: un granuloma si è sviluppato in questo paziente 2 mesi dopo l'iniezione di *Sculptra*.

Il suo utilizzo può essere tecnicamente difficoltoso a causa della formazioni di occlusioni durante le iniezioni effettuate con aghi troppo piccoli, mentre l'utilizzo di aghi più larghi è spesso causa di ematomi (Vochelle D., 2004).

Microsfere di calcio idrossiapatite

Radiesse, conosciuto anche come *Radiance* o *Radiance FN* (BioForm Medical, San Mateo, California, U.S.A.), è stato approvato dalla FDA americana per la correzione di difetti maxillo-facciali, corde vocali insufficienti e come *marker* tissutale radiografico (Johl S.S. *et al.*, 2006).

Il suo uso come *filler* cosmetico è vietato in America, tuttavia sono in corso esperimenti per approvarne l'utilizzo per il trattamento di lipoatrofie facciali e solchi naso-labiali (Johl S.S. *et al.*, 2006).

La principale componente di *Radiesse* è la calcio idrossiapatite, presente sottoforma di sfere di dimensioni che variano dai 25 ai 45 μm di diametro, sospese in un gel acquoso con glicerina e idrossicellulosa di sodio.

L'idrossiapatite è la componente minerale dell'osso, per cui ha un'eccellente biocompatibilità e non richiede preventivi test allergologici. Essa agisce come struttura che sostiene la crescita al suo interno del collagene (Narins NS *et al.*, 2005) nei tessuti molli.

Il prodotto è particolarmente viscoso, ma può essere iniettato con opportuni aghi in distretti subdermali e intramuscolari; è importante modellare il prodotto, una volta iniettato, tramite massaggi (Flaharty P., 2004).

Il materiale iniettato è molto più denso rispetto al tessuto che lo circonda e risulta palpabile per 2-3 mesi; successivamente la crescita di collagene ristabilisce nella zona trattata le caratteristiche naturali di morbidezza.

Dopo l'iniezione, il gel in cui le sfere di idrossiapatite sono immerse viene gradualmente assorbito e degradato dall'azione fagocitaria dei macrofagi nel giro di 6-8 mesi; contemporaneamente i fibroblasti, arrivati in risposta del nuovo impianto, incapsulano le sfere attraverso la produzione di fibre di collagene, impedendone la migrazione (Flaharty P., 2004).

Le particelle di idrossiapatite vengono completamente degradate in calcio e ioni fosfato nel giro di alcuni anni. L'effetto estetico dura in media da 2 a 3 anni.

Evidenze radiografiche mostrano la presenza di materiale anche 7 anni dopo l'impianto, ma escludono fenomeni di calcificazione o di formazione di ossa (Flaharty P., 2004).

È indicato per il trattamento delle rughe profonde, solchi e grinze della pelle; sconsigliato per impianti nelle labbra a causa della significativa incidenza di formazioni nodulari nella sottomucosa (Johl S.S. *et al.*, 2006).

Microsfere di polimetilmetacrilato

Le microsfere di polimetilmetacrilato (PMMA) venivano usate in Europa già dal 1993 per l'aumento del volume facciale sotto il nome commerciale di Artecoll (Artes Medical, San Diego, California, U.S.A.); lo stesso prodotto fu approvato nel febbraio 2003 dalla FDA americana con il nome di ArteFill (Johl S.S. *et al.*, 2006).

Le microsfere di PMMA, di cui *ArteFill* è composto, sono sospese in una soluzione di collagene bovino (*atelo-collagen*) al 3,5%, lidocaina allo 0,3% e NaCl allo 0,3% in PBS (pH 7,3). Complessivamente le microsfere rappresentano il 20% della formulazione, mentre il collagene l'80%.

Le microsfere hanno diametro compreso tra i 30 e i 40 μm ; non più piccole in modo da poter essere iniettate con aghi, né più grandi per prevenire la fagocitosi macrofagica (Thaler M.P. *et al.*, 2005).

L'*atelo-collagen*, che serve a veicolare le microsfere di PMMA, è stato trattato chimicamente in modo da ridurre l'antigenicità; è comunque opportuno effettuare test allergologici prima dell'iniezione (Murray C.A. *et al.*, 2005). Molti autori hanno riportato reazioni allergiche al collagene bovino ed hanno descritto complicanze infiammatorie e granulomi da corpo estraneo in conseguenza dell'uso di *Artecoll*.

Il collagene è rapidamente degradato dalla collagenasi e fagocitato dai macrofagi nel giro di 1-4 mesi; in questo stesso periodo le microsfere di PMMA cominciano ad essere incapsulate dalle fibre di collagene secrete dai fibroblasti dell'ospite, impedendone così la migrazione (Johl S.S. *et al.*, 2006).

ArteFill deve essere iniettato nel derma profondo o nel sottocutaneo, non è indicato per il trattamento delle rughe superficiali.

La correzione iniziale fornita dal prodotto lentamente diminuisce, man mano che il collagene viene degradato. Normalmente il 50-75% della correzione viene mantenuta per un lungo periodo grazie alla permanenza delle microsfere. La completa correzione dell'inetetismo richiede da 2 a 4 sessioni di trattamento a intervalli di 3-4 mesi l'uno dall'altro (Murray C.A. *et al.*, 2005).

I pazienti sottoposti al trattamento devono evitare movimenti mimici nei primi tre giorni dopo l'iniezione, in modo da impedire che la contrazione muscolare possa spingere la sostanza in profondità, nel tessuto sottocutaneo (Narins R.S. *et al.*, 2005).

Il successo di *Artecoll*, come quello di altri *filler* sintetici, sta nella quantità di tessuto connettivale che viene prodotto dal paziente in risposta all'impianto; l'*Artecoll* sfrutta la naturale predisposizione del corpo umano ad incapsulare corpi estranei tramite la formazione di tessuto connettivo.

Le microsfele di PMMA rimangono quindi nei tessuti e, non potendo essere fagocitate e non potendo migrare per le loro dimensioni, determinano un duraturo aumento del tessuto ma anche purtroppo la tendenza a formare granulomi.

Più il paziente è giovane, maggiore è la risposta dell'organismo, che si riflette in un migliore e più duraturo effetto estetico.

In Europa è stato osservato che i risultati, in alcuni pazienti, durano per più di 10 anni.

Gel di poliacrilammide

Il *Formacryl* è il capostipite del gruppo dei nuovi *fillers* a base di poliacrilammide (PAA).

È un polimero acrilato iniettabile, creato e prodotto inizialmente in Russia, che ha la capacità, come tutti i *fillers* a base di PAA, di richiamare acqua dai tessuti circostanti e di non essere riassorbito.

Viene iniettato profondamente ed è pertanto indicato soltanto per il trattamento dei solchi nasolabiali o per l'ingrandimento delle labbra.

Può essere rimosso dalla sede dell'impianto con un'incisione di 1-2 mm circa. In qualche caso ha dato origine ad infezioni tardive, anche 3-5 anni dopo l'impianto.

Contiene il 95% di acqua e circa lo 0,4% di acrilammide monomero, sostanza irritante e probabilmente mutagena.

La Bioform che lo produceva lo ha adesso sostituito con l'*Argiform*. L'equivalente del *Formacryl* prodotto in Italia è il *Bioformacryl*. Quest'ultimo ha presentato gli stessi problemi dell'originale ed è stato a sua volta sostituito da nuove formulazioni. Tra queste troviamo: l'*Aquamid*, prodotto in Danimarca, composto per il 2,5% da polimero reticolato poliacrilammidico e per il rimanente 97,5% da acqua apirogena; il *Dermalive* e il *Dermadeep*.

Questi ultimi rientrano nella categoria dei *filler* miscelanei di natura semi-permanente.

Il loro meccanismo d'azione è simile a quello di *Artecoll*, salvo che, anziché utilizzare il collagene, la soluzione è costituita da acido ialuronico che ha funzione di *carrier* per le particelle di acrilammide. Questa soluzione viene assorbita dopo alcuni mesi.

Dermadeep contiene molte più particelle di acrilato rispetto al *Dermalive* ed è per questo destinato ad essere impiantato soltanto negli strati più profondi, vicino al periostio; viene utilizzato per aumentare le strutture ossee della faccia ed impiantato in sede epi-periosteale; è efficace nel riempire la fossa canina, la regione nasolabiale, per l'incremento del mento e della guancia.

Tuttavia, una volta usato per riempire i difetti già descritti, le particelle e le capsule che si formano possono determinare la formazione di un nodulo rilevabile palpatariamente e a volte anche visibilmente. Tali noduli possono essere presenti anche per i primi sei mesi dopo il trattamento e possono essere eliminati tramite iniezioni di corticosteroidi. Alcuni autori riportano nella loro esperienza clinica, sia con *Dermalive* che con *Dermadeep*, un indurimento notevole, se iniettato nel muscolo o nella mucosa profonda del labbro o intra-dermicamente (Scimè I., 2003).

Destrano

Il *Reviderm-Intra*, come il *Dermalive* e *Dermadeep*, è un *filler* di tipo miscelaneo, in cui le microsfele di destrano vengono miscelate con acido ialuronico.

Si tratta di un gel sterile, di natura visco-elastica che, dopo l'iniezione, stimola la nuova sintesi di collagene endogeno da parte dei fibroblasti dell'ospite. L'acido ialuronico agisce come un regolatore dell'umidità della pelle, restituendole volume ed elasticità.

È un *filler* che garantisce una buona durata dell'effetto correttivo, ma risulta scarsamente biocompatibile ed ha una spiccata tendenza alla formazioni di granulomi.

Questo *filler* dovrebbe essere iniettato nello spessore intradermico, per cui risulta indicato per la correzione dei solchi nasolabiali ed, in alcuni casi, nei trattamenti mirati di aumento del volume delle labbra.

Tra le complicanze sono state riportate la comparsa di granulomi, l'indurimento della pelle, l'edema della parte infiltrata e arrossamenti localizzati, inoltre, il destrano è

contro indicato ai pazienti che presentano una tendenza a sviluppare cheloidi (Scimè I., 2003).

Gel di polialchilimide: Bio-AlcamidTM

Proprietà chimiche e fisiche

Il **BioAlcamidTM**, risultato della ricerca dei laboratori italiani *Polymekon*, nonché oggetto di studio di questa tesi di dottorato, è un *hydrogel* traslucido composto per il 4% da polialchilimide (PAI) e per 96% da acqua apirogena; rappresenta un'evoluzione del *Bioformacryl*, dal quale si differenzia poiché non contiene poliacrilammide (Pacini S. *et al.*, 2003, 2004).

Gli *hydrogels* sono dei *network* tridimensionali idrofobi, insolubili in acqua a causa della presenza di *crosslinks* chimici e/o fisici (Fournier E. *et al.*, 2003).

Le molecole di cui è composto BioAlcamid sono fisicamente e chimicamente stabili. E' un gel insolubile in acqua anche ad elevate temperature, ha un elevato grado di elasticità, non è allergenico (Casavantes L.C. *et al.*, 2004), ha un pH intorno a 6.9 e non presenta monomeri (0 ppm) (Lafarge Claque B. *et al.*, 2004).

La sua caratteristica chimico-fisica principale consiste nel fatto che, dopo l'impianto, non viene integrato nei tessuti che lo circondano e, per questo motivo, può essere facilmente rimosso.

Dunque, è un *hydrogel* non riassorbibile, utilizzato per ricostruzioni a lungo termine del tessuto danneggiato grazie alle sue proprietà che lo rendono simile ad una endoprotesi (Pacini S. *et al.*, 1997): subito dopo l'iniezione all'interno del tessuto sottocutaneo, l'organismo ospite sviluppa una membrana molto fine di collagene (0,2 mm circa) che avvolge il biopolimero, rendendolo simile ad una vera e propria protesi.

Test comparativi del *Bioalcamid* con altri *hydrogels* non riassorbibili ne hanno escluso la capacità di indurre la formazione di granulomi in risposta ad un processo infiammatorio; inoltre, è stato osservato come il prodotto, una volta impiantato, non diffonda al di fuori dell'area d'iniezione (Lafarge Claque B. *et al.*, 2004).

Indicazioni del Bio-Alcamid™

Il BioAlcamid è stato utilizzato per aumentare il volume sia di piccole e medie aree del viso che di zone molto estese del corpo. Esso, infatti, è disponibile in commercio in tre versioni (Lafarge Claque B. *et al.*, 2004):

- *Lips*, studiato per l'aumento del volume delle labbra;
- *Face*, per la correzione degli inestetismi del viso e per l'aumento di zigomi;
- *Body*, adatto a grandi riempimenti.

Il suo utilizzo è indicato per la correzione di ipovolumetrie causate da traumi post-operativi, malformazioni congenite, lipoatrofia indotta da farmaci come nei pazienti HIV⁺ (fig. 1.15), nei casi di Sindrome di Poland e, nella Medicina Estetica, per correggere ipovolumetrie inerenti labbra, zigomi, solchi e cicatrici.

La FDA americana ne ha riconosciuto l'utilizzo per il trattamento della sindrome d'atrofia emifacciale di Perry-Romberg (fig. 1.16).



Fig. 1.15: correzione di deficit tissutale in un caso di lipoatrofia farmaco-indotta in soggetto HIV⁺.

Il Bioalcamid non dà reazioni allergiche, pertanto non è necessario fare il test di sensibilizzazione come per il collagene. L'infezione è una complicanza infrequente, ma si può verificare a distanza di 1-2 mesi dall'impianto; in questi casi è necessario rimuovere la sostanza iniettata e drenare la raccolta infetta.

Le ricerche condotte dal dott. Giovanni Guaraldi (Clinica delle Malattie Infettive e Tropicali Policlinico Universitario di Modena; membro Nadir Onlus – HIV *treatment group*) sull'utilizzo della polialchilimmide come riempitivo per la correzione di

alcune delle manifestazioni morfologiche che caratterizzano la sindrome lipodistrofica, fenomeno frequente nei pazienti affetti da HIV trattati con una terapia anti-retrovirale, descrivono l'insorgere di alcune complicanze dovute a contaminazione batterica del prodotto o alla comparsa di granulomi da corpo estraneo.



Fig. 1.16: correzione di deficit tissutale in caso di atrofia emifacciale (sindrome di Parry-Romberg).

Uno studio multicentrico condotto da diversi ospedali e università italiane ed estere su 2000 pazienti ha dato, invece, risultati molto soddisfacenti: soltanto in 12 casi (0,6%) si sono verificate complicanze post-operative (infezioni da Stafilococco) e soltanto 3 di questi erano direttamente imputabili al polimero; gli altri erano dovuti ad inadempienze tecniche durante l'iniezione o a mancanza di attenzione dei pazienti nel seguire i suggerimenti del medico nel periodo post-operatorio. I pazienti che non avevano manifestato alcuna complicanza (1988/2000) erano completamente soddisfatti del trattamento chirurgico: all'esame medico i risultati estetici apparivano eccellenti poiché gli impianti sembravano uniformemente distribuiti, senza segni di migrazione o dislocazione, inoltre si osservava assenza di granulomi, risposta allergica o di qualunque tipo di intolleranza (Pacini S. *et al.*, 2002).

Alcol polivinilico: Bioinblue™

Proprietà chimiche e fisiche

Il *Bioinblue*™, anch'esso prodotto dai laboratori italiani *Polymekon*, è un *filler* sintetico a lenta degradazione, costituito per il 6% da alcol polivinilico (PVA) *crosslinkato* con metodo fisico (cicli successivi di congelamento-scongelamento) e per il restante 94% da acqua apirogena (fig. 1.17) (Dini *et al.*, 2005).

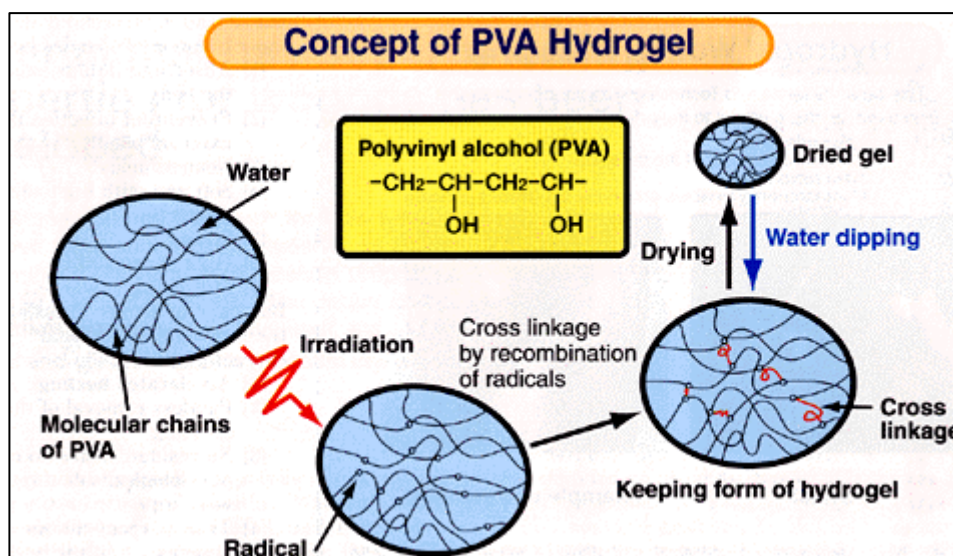


Fig. 1.17: la formula chimica del PVA e le varie tappe dello schema di sintesi.

Le sue proprietà fisiche dipendono dal metodo di preparazione, a seconda che si tratti di idrolisi totale o parziale del polivinil acetato; variando la lunghezza della catena iniziale di polivinilacetato e il grado di idrolisi in condizioni alcaline o acide, si ottengono prodotti con differente peso molecolare (20.000-400.000), solubilità, flessibilità, forza tensile (DeMerlis C.C. *et al.*, 2003).

La proprietà che distingue il PVA dagli altri polimeri di sintesi è la sua solubilità in acqua, dovuta all'alta concentrazione di gruppi ossidrilici presenti nella sua catena. Il PVA è, quindi, un polimero altamente igroscopico e l'acqua ha un ruolo molto importante nella determinazione delle proprietà del materiale, che variano al variare della quantità d'acqua assorbita (Nagaoka S. *et al.*, 1990).

È un *filler* interamente biodegradabile che viene metabolizzato in acido aceto acetico nell'organismo (Isolyser, 1998). Studi istologici hanno dimostrato che, subito dopo

l'impianto, il gel subisce una lenta degradazione e viene sostituito in maniera isovolumetrica da collagene neoformato.

La lenta degradazione è favorita dalla struttura chimica del *filler* che ne garantisce tempi d'assorbimento più lunghi rispetto ai *filler* di origine naturale, assicurando un effetto estetico più duraturo.

Indicazioni del Polivinilalcol

Il polivinilalcol appartiene ad una classe di polimeri sintetici che venivano utilizzati già a partire dal 1930 per applicazioni industriali, commerciali, mediche e alimentari (*food packaging*) (DeMerlis C.C. *et al.*, 2003).

Per la sua inerzia e la capacità di non indurre risposte di tipo immunitario, l'alcol polivinilico sottoforma di microsfeere è ampiamente utilizzato in medicina per il rilascio controllato di farmaci orali (DeMerlis C.C. *et al.*, 2003) e perfino come sostituto del plasma, di cui ha la stessa pressione osmotica. La sua elevata permeabilità all'ossigeno e flessibilità lo rendono particolarmente adatto alla costruzione di lenti a contatto morbide (*CIBA daily disposable lens*) (Nakamura *et al.*, 2001) ed inoltre rientra nella preparazione di soluzioni oftalmiche come ad esempio le lacrime artificiali (Wade and Weller, 1994).



Fig 1.18: correzione dei solchi nasolabiali con Bioinblue.

Nel campo della Medicina Estetica, il *Bioinblue* è indicato per la correzione degli inestetismi del volto come solchi naso-labiali (fig 1.18), aumento degli zigomi, riempimento di cicatrici atrofiche, incremento del volume delle labbra, modellamento del naso e per il sollevamento dell'arcata sopraccigliare. Per quanto

riguarda la tecnica di impianto, si può iniettare in vari livelli cutanei: nel derma superficiale, nel derma profondo e nell'ipoderma.

I poliuretani

Un'altra classe di polimeri sintetici, oggetto di studio di questa tesi, è quella dei poliuretani la cui storia inizia nel 1937, quando Otto Bayer sintetizza il primo poliuretano, ma è nel 1961 che questo polimero viene utilizzato per la prima volta come biomateriale, cioè come componente di un dispositivo biomedico (Mirkovitch V. *et al.* 1961). Questo utilizzo ha dato però deludenti risultati ed è stato abbandonato perché si innescavano, dopo l'impianto dei poliuretani, fenomeni di biodegradazione e riassorbimento a livello della superficie del materiale a contatto con i tessuti, con conseguente perdita delle caratteristiche originarie di forma e resistenza (Eberarth A. *et al.* 1999). Negli ultimi anni, grazie ai progressi compiuti in campo chimico, sono stati realizzati nuovi poliuretani "biostabili" (Pinchuk L., 1994), con migliori proprietà elastomeriche e che hanno dimostrato una più alta resistenza meccanica e all'abrasione, minor attrito, buona compatibilità tissutale e facilità nell'essere processati.

Il problema della biodegradazione dei poliuretani sintetizzati in passato è stato superato introducendo un appropriato rapporto di concentrazione tra i segmenti *hard* (costituiti da diisocianato) rispetto a quelli *soft* (poliesteri o polieteri) nella catena polimerica. Recenti osservazioni sperimentali hanno dimostrato che polimeri con una minore concentrazione di segmenti *hard* hanno un numero maggiore di gruppi carbossilici esposti sulla superficie, per cui risultano maggiormente esposti a fenomeni degradativi (Santerre J.P. *et al.* 1997); per questo, poliuretani con alta concentrazione di segmenti *hard* vengono utilizzati con successo nella realizzazione di ventricoli per cuori artificiali (fig. 1.19), valvole cardiache biomorfe, protesi mammarie, cateteri e palloni da angioplastica.

Il fenomeno della facile degradazione del PU avrebbe potuto rappresentare un rischio per la salute umana, dal momento che molti tipi di PU contengono diisocianati aromatici che nell'organismo vengono convertiti in diamine aromatiche che sono tossiche e potenzialmente carcinogene per l'uomo (Batich C *et al.*, 1989; Szycher M., 1988).



Fig. 1.19: cuore artificiale AbioCor® (Abiomed Corp.) approvato dalla U.S. FDA nel settembre 2006. Le membrane all'interno dei ventricoli sono in poliuretano (Angioflex).

Tuttavia, negli ultimi anni sono stati sviluppati PU biodegradabili a base di diisocianati alifatici (Spaans CJ., 2000) che non rilasciano prodotti di degradazione potenzialmente tossici; questi elastomeri trovano impiego nell'ingegneria dei tessuti molli per la realizzazione di impianti riassorbibili o semi-permanenti (Gretzer C. *et al.*, 2003).

I poliuretani vengono utilizzati, in particolare, per la fabbricazione di dispositivi che devono entrare in contatto con il sangue e, in questo ambito, si sono sviluppati poliuretani in grado di rilasciare farmaci, come l'eparina o l'aspirina, che ne migliorano l'emocompatibilità. L'utilizzo di questi nuovi elastomeri per la fabbricazione di condotti vascolari ha permesso la realizzazione di protesi in grado di attivare moderatamente i processi coagulativi e che raggiungono proprietà di resistenza ed elasticità simili a quelle dei vasi naturali (Miyamoto K. *et al.* 1999, Eberhart A. *et al.* 1999, Doi K. *et al.* 1996, Okoshi T. *et al.* 1995); inoltre, i poliuretani utilizzati per la realizzazione di protesi vascolari possono fornire un substrato potenziale per la crescita di cellule endoteliali (fig. 1.20), in modo da ottenere un condotto vascolare in grado di simulare le funzioni biologiche dell'endotelio *in vivo* (Baumgartner J.N. *et al.* 1998; Doi K. *et al.* 1997; Liu S.Q. *et al.* 1992).



Fig. 1.20: valvola cardiaca in poliuretano endotelizzato

I miglioramenti apportati con queste modifiche sono comunque ancora lontani dal risolvere il problema in maniera definitiva.

La ricerca è orientata alla realizzazione di protesi vascolari di piccolo diametro, che troverebbero un ampio impiego clinico nel settore delle malattie cardiovascolari (Van Oeveren W. *et al.* 1995).

1.4 Risposta immune all’impianto di un biomateriale

L’impianto di materiali biomedici innesca una risposta infiammatoria che è il risultato della presenza del biomateriale e del trauma chirurgico a livello tissutale.

Il materiale, riconosciuto come corpo estraneo, scatena una prima infiammazione locale non specifica (*immunità innata*), a cui può far seguito una reazione infiammatoria sistemica (*immunità adattativa*) che è diretta verso uno stimolo e/organismo estraneo specifico ed è caratterizzata da cambiamenti stressogeni nel sistema neuroendocrino e nel sistema immune (fig.1.21) (Khansari D.N. *et al.* 1990; Kushner I. *et al.* 1982).

L’entità della reazione dipende soprattutto dalle caratteristiche chimiche e fisiche dell’impianto; ad esempio, quando il biomateriale rilascia detriti sottoforma di particelle di varie dimensioni, le cellule del sistema infiammatorio aderiscono ad esse ma non riescono a fagocitarle perché troppo grandi (“*frustrated phagocytosis*”) e ciò scatena il rilascio di enzimi e di mediatori chimici (prostaglandine, citochine, ecc.) che danneggiano i tessuti che circondano il materiale impiantato.

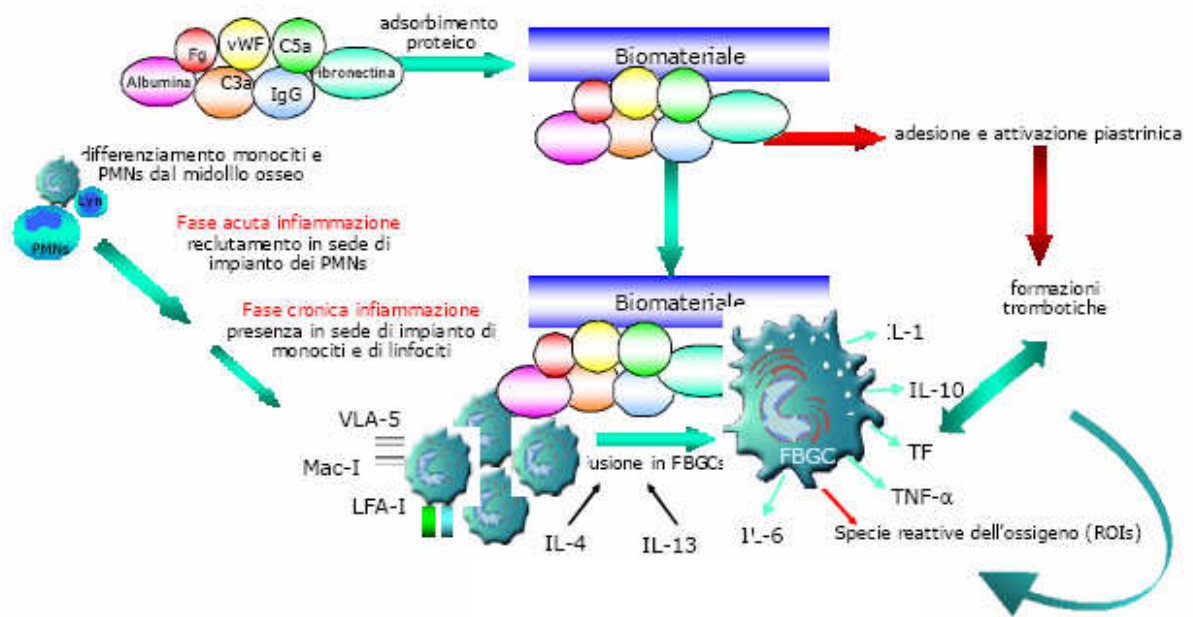


Fig 1.21: rappresentazione schematica della risposta infiammatoria innescata dall'impianto di un biomateriale (da Thomsen P. *et al.* 2001).

In altri casi, se il materiale è inerte, viene racchiuso da sottile capsula composta di collagene e fibroblasti e non si osservano eventi infiammatori (Schoen F.J., 2004).

Le interazioni tessuto-biomateriale possono essere controllate modificando la chimica della superficie (ad es. aggiungendo specifici gruppi chimici che stimolano l'adesione o la formazione dell'osso negli impianti ortopedici), aumentandone la ruvidità o porosità per facilitare il legame fisico ai tessuti circostanti o introducendo agenti *surface active* che leghino chimicamente i tessuti o, ancora, utilizzando componenti riassorbibili che vengano sostituite dal tessuto rigenerato (Schoen F.J., 2004).

L'intensità e/o la durata della risposta infiammatoria caratterizza la "biocompatibilità" di un biomateriale, intesa come "l'abilità di un materiale di eseguire una specifica applicazione destando una appropriata risposta nell'ospite"(II Consensus Conference on Definition in Biomaterials, Chester, UK, 1991): fino a pochi anni fa si riteneva che un materiale biocompatibile non dovesse innescare alcuna reazione nell'organismo ospite, né di rifiuto né di riconoscimento.

Tale concetto di inerzia totale è stato oggi abbandonato, poiché nessun dispositivo medico che sia tollerato passivamente dall'organismo, e non stimoli un'incorporazione ed un riconoscimento, può assicurare la stabilità delle sue prestazioni nel lungo periodo.

1.4.1 L'infiammazione

L'infiammazione generalmente è definita come la reazione di un tessuto vivente vascolarizzato ad un danno locale. Essa serve per isolare, neutralizzare, eliminare gli agenti responsabili di tale danno. In aggiunta, essa scatena una serie di eventi che possono portare alla guarigione e alla ricostituzione del tessuto danneggiato attraverso la rigenerazione delle cellule parenchimali native, attraverso la formazione di tessuto cicatriziale (fibroblasti) o con la combinazione di questi due processi (Anderson J. M., 2004).

Questa complessa sequenza di eventi, che coinvolgono proteine ematiche, cellule del tessuto ospite e la superficie del biomateriale, termina con la restaurazione dell'omeostasi attraverso meccanismi locali e sistemici ed è caratterizzata da due stadi principali: lo stadio acuto e lo stadio cronico.

La risposta infiammatoria di fase acuta (*acute phase response*, APR) rappresenta la difesa immediata che l'organismo attiva contro il corpo estraneo; si sviluppa nel giro di pochi minuti, ore o al massimo giorni e la sua durata e intensità dipendono dall'estensione del danno provocato dall'impianto e dalla forma, dimensioni, topografia, proprietà chimico-fisiche del biomateriale. Si parla di risposta infiammatoria di fase cronica (*chronic phase response*, CPR) per indicare la risposta che subentra quando lo stimolo infiammatorio persiste; tale reazione spesso si sovrappone all'APR (fig. 1.21).

Infiammazione acuta

L'APR è caratterizzata da un rapido cambiamento nei livelli di proteine plasmatiche conosciute come proteine di fase acuta (*acute phase proteins*, APPs). Le APPs rappresentano un gruppo estremamente eterogeneo di proteine coinvolte in varie funzioni biologiche; in particolare, queste svolgono un'azione modulatrice sulla risposta immune, sulla coagulazione, sulla fibrinolisi, sull'attivazione della cascata del complemento, dei processi chemiotattici e di opsonizzazione e della proteolisi (Koj A., 1985).

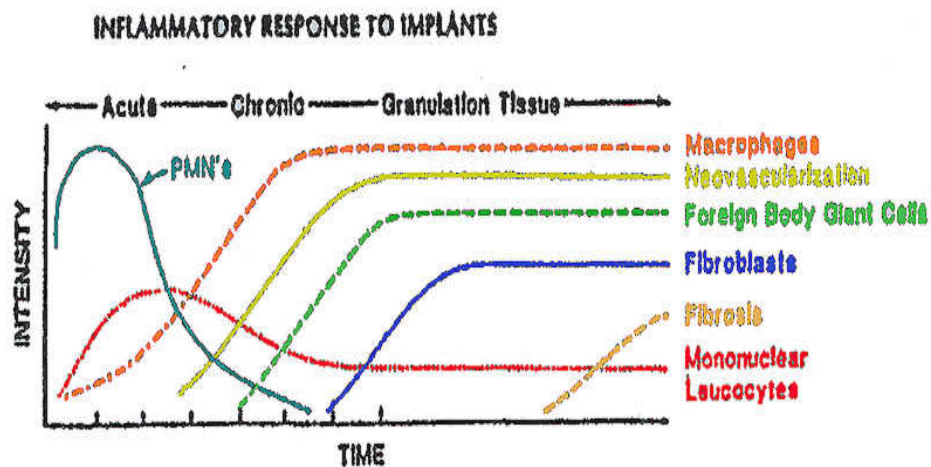


Fig. 1.22: andamento della risposta infiammatoria nel tempo (da Anderson J.M., *Biomaterials Science*, 2nd Edition, 2004)

Durante l'APR si assiste ad un aumento nella produzione delle APPs cosiddette "positive", capaci di amplificare l'infiammazione (siero amiloide-A, proteina C, fibrinogeno, antitripsina α -1, proteine del complemento come il fattore B e C3, aptoglobine) e contemporaneamente ad una diminuzione delle APPs cosiddette "negative" come l'albumina, la transferrina e la transtiretina (Rihova B., 1996).

In questa fase si verifica il rilassamento delle pareti arteriolari con un conseguente dilatamento del lume dei vasi che comporta un forte afflusso di sangue nel tessuto danneggiato; inoltre, aumenta la permeabilità vascolare e ciò facilita la migrazione dei leucociti, soprattutto neutrofili, nel sito infiammatorio. Tale fenomeno è mediato dall'adesione dei leucociti alle pareti dei vasi, grazie all'interazione con tre principali famiglie di recettori: le selettine, le integrine e membri della superfamiglia delle

immunoglobuline (Jones D.A. *et al.*, 1996). L'azione principale dei neutrofili consiste nel fagocitare microrganismi e corpo estraneo. La fagocitosi è un processo in suddiviso in tre fasi che comprendono il riconoscimento e la formazione di un coniugato con l'agente infiammatorio, a cui fanno seguito l'*engulfment* (internalizzazione) e la degradazione o l'uccisione dello stesso. Sebbene i biomateriali generalmente non vengano fagocitati dai neutrofili o dai macrofagi a causa delle loro grandi dimensioni, si verificano comunque le fasi di riconoscimento e attacco al corpo estraneo: infatti, il biomateriale viene ricoperto da proteine plasmatiche chiamate "opsonine", in particolare immunoglobulina G (IgG) e la frazione C3b del complemento, che vengono riconosciute da recettori presenti su neutrofili e macrofagi. Altre proteine plasmatiche quali fibronectina, fibrinogeno e vitronectina favoriscono l'adesione cellulare alla superficie del biomateriale.

La fase acuta, inoltre, è caratterizzata dalla degranulazione dei mastociti con conseguente rilascio di istamina (Zdolsek J *et al.*, 2007; Tang L *et al.*, 1998), che media il reclutamento di fagociti e la loro adesione alla superficie dell'impianto, e delle linfocine IL-4 e IL-13, che promuovono la fusione dei macrofagi in cellule giganti multinucleate (FBGCs) (Chang D.T. *et al.*, 2008).

I neutrofili hanno una breve emivita (24-48 h), motivo per cui vengono rapidamente sostituiti dai monociti che hanno differenziato in macrofagi, la cui migrazione nel tessuto danneggiato continua per un periodo più lungo, da giorni a mesi, a seconda della persistenza del danno e degli stimoli chemiotattici (fig 1.23) (Anderson J.M., 2004).

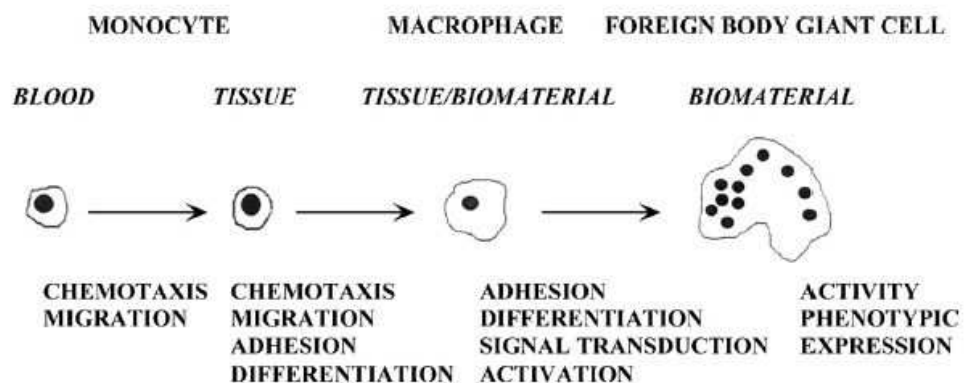


Fig 1.23: percorso dei monociti dal sangue periferico fino all'interfaccia tessuto-biomateriale e successivi stadi del loro differenziamento fino a macrofagi e FBGCs (Anderson JM *et al.*, 2007).

La fase acuta si risolve rapidamente, generalmente in meno di una settimana; in ogni caso ciò dipende dall'estensione dell'area danneggiata dall'impianto.

Infiammazione cronica

La risposta infiammatoria cronica è caratterizzata dalla presenza di cellule mononucleate ossia monociti, macrofagi, linfociti e plasmacellule e dalla formazione di vasi sanguigni e tessuto connettivo. Essa può verificarsi quando lo stimolo infiammatorio persiste, come nel caso di un biomateriale che non venga fagocitato a causa delle sue dimensioni: i macrofagi che falliscono nella fagocitosi possono fondersi tra loro dando origine a cellule giganti multinucleate (FBGCs) (fig 1.22) che, insieme ai fibroblasti, al collagene rilasciato da quest'ultimi e ai capillari neoformati, formando il cosiddetto "tessuto di granulazione". La formazione di questo tessuto è un indice di guarigione: il collagene e i proteoglicani rilasciati incorporano il biomateriale all'interno di una capsula fibrosa che impedisce al materiale di diffondere nell'ambiente circostante e allo stesso tempo garantisce il rifornimento di ossigeno e nutrienti alle cellule della capsula.

In altri casi, ben più rari, il tessuto danneggiato dall'impianto può essere sostituito da cellule parenchimali dello stesso tipo e riacquistare completamente la sua struttura originaria: ciò dipende dalla capacità proliferativa cellulare e dalla estensione del danno (Anderson J. M., 2004).

Se il materiale impiantato diventa uno stimolo permanente, poiché subisce una degradazione molto lenta e tanto meno viene circondato dalla capsula, esso può indurre la formazione di un "granuloma", che si distingue dal tessuto di granulazione di cui detto sopra in quanto è formato da macrofagi modificati chiamati "cellule epitelioidi" (Anderson J. M., 2004). Se il materiale è tossico, quest'ultimi falliscono nel digerire le particelle che hanno incorporato, perciò muoiono e rilasciano nell'ambiente circostante enzimi che provocano la necrosi dei tessuti (Fournier E. *et al.*, 2003).

1.4.2 Assorbimento proteico sulla superficie del biomateriale

Modulazione dell'attività leucocitaria

In seguito al contatto del sangue con una superficie artificiale, il sistema emostatico può rispondere in diversi modi a seconda della natura e della durata dello stimolo. Dalla letteratura è noto che il primo evento scatenato dal contatto del sangue con una superficie artificiale è un rapido fenomeno di “assorbimento proteico” che sarà un prerequisito per la successiva adesione e attivazione dei leucociti e per i processi infiammatori da essi mediati. La composizione dello strato proteico è influenzata dalla natura del biomateriale e dal tempo di esposizione. E' stata dimostrata la presenza di diverse proteine; alcune sono implicate in fenomeni di adesione cellulare quali fibrinogeno, fibronectina, trombospondina, fattore di von Willebrand, vitronectina, collagene, laminina, albumina e γ -globulina; altre sono le proteine del complemento e fattori della coagulazione come il fattore XI, il fattore XII, chininogeni ad alto peso molecolare e precallieina. E' stato dimostrato che l'assorbimento proteico dipende dalla chimica di superficie dei biomateriali, ed in particolare lo strato di proteine assorbite, il tipo, la quantità e lo stato conformazionale delle proteine stesse a loro volta influenza il comportamento macrofagico in termini di adesione, attivazione e fusione in FBGCs e quindi, in ultima analisi, l'entità e la durata del processo infiammatorio. E' noto che alcune proteine plasmatiche come il fibrinogeno, la fibronectina e l'immunoglobulina G (IgG) hanno la capacità di promuovere *in vitro* e *in vivo* adesione e rilascio di citochine, mentre l'albumina e altre proteine tendono a rendere inerti le superfici su cui sono adsorbite (Collier T.O. *et al.* 2001).

Recentemente è stato dimostrato che l'assorbimento di fibrinogeno causa un aumento nella produzione monocitaria delle citochine proinfiammatorie IL-1 α e IL-1 β e anti-infiammatorie come IL-10, oltre a modulare l'espressione dell'antigene CD14 e l'apoptosi/necrosi (Gretzer C. *et al.* 2000). Inoltre, anche la fibronectina può indurre un significativo aumento nella produzione di IL-1 in cellule macrofagiche (Schmidt D.R. *et al.* 2006); è stato osservato che un ruolo critico nel legame tra i recettori integrinici e le proteine plasmatiche si esplica attraverso un aumentato livello di fosforilazione tirosinica di una proteina di 76 kDa (pp76), che risulta associato ad un aumento nell'espressione dell'mRNA codificante per IL-1 (Lin T.H. *et al.* 1994).

Questa interazione proteina-recettore è in grado di determinare l'attivazione del fattore di trascrizione nucleare kappa B (NF- κ B) e la fosforilazione tirosinica della tirosin chinasi Syk, eventi molecolari che potrebbero avere un ruolo cruciale nella cascata di trasduzione del segnale che determina la trascrizione del gene di IL-1 (Lin T.H. *et al.* 1995).

L'effetto dell'assorbimento proteico sulla formazione delle FBGCs resta da definire; è stato osservato che le FBGCs tendono a formarsi più facilmente su superfici sintetiche ruvide e idrofobiche e più difficilmente nel caso di superfici anioniche (Behling C.A. *et al.* 1986). Inizialmente, non sembrava esservi correlazione tra la formazione delle FBGCs e la presenza di determinate proteine (come ad esempio albumina, C3b, fibronectina, IgG, trombospondina, vitronectina e vWF), tuttavia uno studio più recente supporta l'esistenza di un ruolo nella formazione delle FBGCs da parte delle proteine assorbite, in termini di produzione sia citochinica che di espressione dei recettori di membrana integrinici β_1 e β_2 ; tali proteine sono implicate nelle interazioni cellula-cellula che favoriscono la fusione (McNally A.K. *et al.* 2002).

Le interazioni specifiche tra le proprietà chimico-fisiche dei materiali e il comportamento macrofagico restano ancora da chiarire e, solo attraverso una maggiore conoscenza dei meccanismi alla base di tale fenomeno, si potrà ottenere un miglioramento dei biomateriali utilizzati per la costruzione di *devices* biomedici.

Un importante studio in questo ambito è stato condotto modificando chimicamente una superficie base di polietilene tereftalato (PET) per indagarne gli effetti in vitro su monociti umani: tali modificazioni sono state realizzate mediante fotopolimerizzazione che ha consentito di ottenere superfici idrofobiche, idrofiliche, anioniche e cationiche, che hanno dimostrato una produzione citochinica selettiva da parte di monociti/macrofagi (Brodbeck W.J. *et al.* 2002). E' stato dimostrato che l'espressione della citochina anti-infiammatoria IL-10 risulta significativamente aumentata nelle cellule aderenti alle superfici idrofobiche e anioniche, mentre l'espressione di IL-8, citochina ad azione notoriamente proinfiammatoria, risulta significativamente diminuita; inoltre, le superfici idrofobiche e anioniche hanno indotto un aumento nella percentuale di cellule apoptotiche e una diminuzione nella percentuale di adesione e di fusione in FBGCs e, per tale ragione, risultano avere notevole capacità anti-infiammatoria che potrebbe consentire un aumento nella biostabilità e biocompatibilità dei *devices* sintetici

Ruolo delle proteine del complemento

Il sistema del complemento, costituito da oltre 30 proteine plasmatiche, rappresenta un effettore critico nella risposta infiammatoria e coinvolge tre distinti *pathways*: classico, alternativo ed il più recentemente descritto “*lectin pathway*”.

La via classica è attivata dagli anticorpi legati all'antigene e quindi fa parte della risposta umorale acquisita. Il *lectin pathway* è indipendente dagli anticorpi in quanto viene innescato dal legame della lectina legante il mannosio (MBL) o ficolina a specifici carboidrati presenti sulla superficie dei microrganismi (Nilsson Bo *et al.*, 2007). La via alternativa può essere attivata allorché un componente del sistema, attivato spontaneamente, lega la superficie di un corpo estraneo; questa reazione fa parte dell'immunità innata.

L'attivazione della cascata del complemento avviene in seguito al contatto del sangue con il biomateriale e ha un ruolo fondamentale nel reclutare cellule fagocitiche che possano distruggere e digerire l' “intruso”; è stato osservato che, inizialmente, l'attivazione si realizza tramite la via alternativa che può essere seguita da quella classica.

La via alternativa (fig 1.24) è innescata da un cambiamento conformazionale di una piccola porzione di molecole C3 che risulta nell'idrolisi di un gruppo tioestere e nella formazione di una forma attivata di C3, chiamata C3(H₂O) (“C3-water”), che legherà il fattore B. Il complesso C3(H₂O)-B è un substrato per il fattore D, una serina proteasi che taglia la proteina B formando la C3/C5 convertasi che taglierà molte molecole C3 a formare C3b. Quest'ultime si legano covalentemente alla superficie del corpo estraneo, soprattutto materiali a base di cellulosa o nylon; il riconoscimento di C3b da parte del fattore B ed il successivo taglio da parte del fattore D generano la cosiddetta fase di amplificazione in cui vengono prodotte moltissime C3 convertasi e, di conseguenza, moltissimi frammenti C3b che satureranno la superficie del biomateriale e richiameranno le cellule fagocitiche. Inoltre, la C3/C5 convertasi agisce sulla proteina C5 generando i frammenti C5a e C5b. C5a è un potente mediatore dell'infiammazione: insieme a C3a fa parte delle anafilotossine che stimolano il rilascio di istamina da parte dei mastociti e causano la contrazione dei muscoli lisci che determina l'aumento della permeabilità vascolare; in aggiunta C5a

si lega a specifici recettori su neutrofili e monociti, stimolando la chemiotassi di queste cellule nel sito danneggiato.

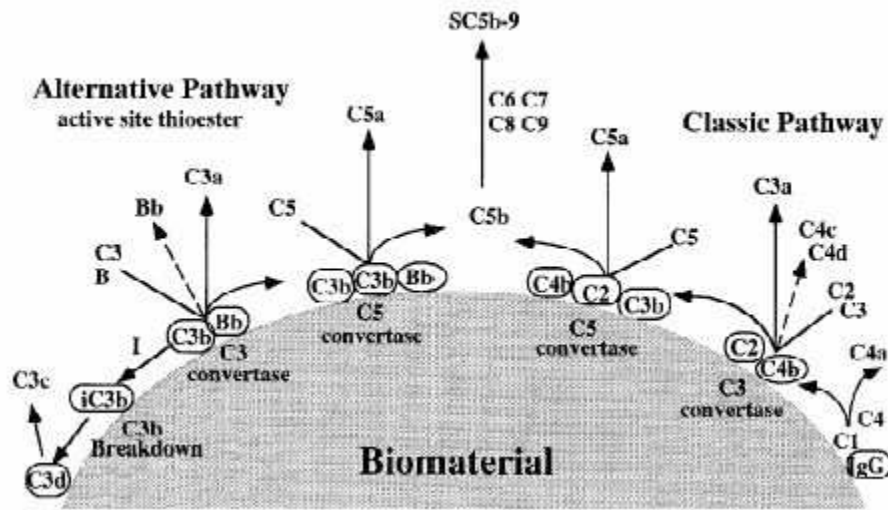


Fig 1.24: rappresentazione schematica dei processi coinvolti nell'attivazione del sistema del complemento indotta dall'impianto di un biomateriale (da Gemmel C.H., 1997).

La produzione di C5b determina la formazione di un complesso macromolecolare di proteine chiamato MAC (*membrane attack complex*), che distruggono il doppio strato lipidico determinando la morte della cellula bersaglio. In alcuni casi C5, piuttosto che essere convertito in C5b dalla C5 convertasi, può essere modificato da agenti ossidanti (H_2O_2 , anione superossido), originando C5b-like che si lega a C6; il complesso ossidato C5-C6 può legare C7, C8 e C9 e formare la forma litica di MAC (Johnson R.J., 2004).

In relazione alla natura della superficie del materiale, la proteina C3b, in alternativa, può andare incontro a un processo di inattivazione catalizzato dal Fattore I in presenza del Fattore H che porta alla formazione di iC3b, inibendo la conversione di C5 che terminerebbe nell'attivazione del complemento.

La via classica del complemento si distingue da quella precedentemente descritta poichè è iniziata dall'attivazione del complesso C1, ma comporta in ogni caso l'assemblaggio delle convertasi classiche C3/C5 e l'opsonizzazione dell'agente infiammatorio (Johnson R.J., 2004).

I prodotti di attivazione del complemento modulano diverse funzioni macrofagiche e processi infiammatori: le proteine C3b o iC3b, adsorbite sulla superficie del materiale, risultano ligandi per i macrofagi attraverso i recettori di membrana CD35

o CD11/CD18 e CD11c/CD18 rispettivamente. I fattori solubili come C5a, d'altra parte, sono in grado di stimolare la chemiotassi leucocitaria, l'adesione e la secrezione di specie reattive dell'ossigeno e di citochine durante la risposta infiammatoria (Kao W.J. 1999).

L'importanza dell'assorbimento delle proteine del complemento sulla superficie del biomateriale deriva anche dalla recente dimostrazione di un loro coinvolgimento nella formazione di trombi in seguito all'impianto. La reazione trombotica al biomateriale, che si verifica soprattutto nel caso di protesi cardio-vascolari, richiede oltre al sistema del complemento, l'attivazione del sistema estrinseco ed intrinseco della coagulazione, del sistema fibrinolitico, del sistema di generazione della chinina e la presenza delle piastrine (Anderson J.M. *et al.*, 2007).

Le piastrine, o trombociti, sono elementi cellulari ematici privi di nucleo, di forma discoidale, con diametro compreso tra 3 e 4 μm (fig. 1.25); esse non sono cellule vere e proprie, ma frammenti citoplasmatici dei megacariociti, precursori di grosse dimensioni presenti nel midollo osseo (Gorbet M.B. *et al.*, 2004).



Fig 1.25: fotografia al SEM (Scanning Electron Microscope) di piastrine adese alla superficie di un biomateriale.

La principale funzione delle piastrine è quella di mantenere l'integrità della parete vasale. A tal fine, esse sono capaci di attivarsi a seguito di modificazioni del flusso ematico o della matrice sub-endoteliale dei vasi e aderire alla parete vasale, aggregarsi tra loro (aggregazione omotipica) e rilasciare all'esterno il contenuto dei

loro granuli citoplasmatici (ADP, serotonina, adrenalina). In passato, il meccanismo alla base dell'attivazione piastrinica in risposta ai biomateriali si riteneva fosse innescato o dalla produzione di trombina, dovuta all'attivazione della via estrinseca della coagulazione, o dal rilascio di ADP da parte dei globuli rossi danneggiati e delle stesse piastrine. Negli ultimi anni si è osservato che le piastrine hanno un recettore per la proteina del complemento C1q; tale recettore può indurre attivazione delle glicoproteine GPIIb/IIIa e l'espressione di P-selectina (Peerschke E.I. *et al.* 1998), una proteina di membrana che interagendo con il proprio ligando (PSGL-1, CD162), presente sulla superficie di neutrofili e monociti, favorisce il formarsi di aggregati eterotipici tra piastrine e globuli bianchi.

La formazione di questi coniugati ha come effetto di incrementare la reazione cellulare infiammatoria ed il danno tissutale locale, in quanto l'interazione tra piastrine e fagociti aumenta su questi ultimi l'espressione del complesso integrinico CD18/CD11b e, come conseguenza, ne favorisce l'adesione all'endotelio infiammato e la migrazione all'interno dei tessuti.

L'interazione eterotipica tra piastrine e altri tipi cellulari può svolgere un ruolo anche nelle fasi iniziali della risposta immune; infatti, è stato recentemente osservato che l'espressione del CD40-ligando sulla superficie di piastrine attivate può servire come precoce segnale co-stimolatorio per la risposta di cellule dendritiche ad antigeni tissutali. Queste evidenze inducono a ritenere che la formazione di aggregati leucopiastrinici possa avere un significato fisiopatologico e prognostico nell'evoluzione di alcune condizioni cliniche caratterizzate da un'intensa reazione infiammatoria tissutale (ad esempio, al momento della riperfusione miocardica dopo circolazione extracorporea).

E' stato osservato *in vivo* che l'assenza di adesione piastrinica sulla superficie di dispositivi artificiali non preclude il processo di attivazione (Gemmel C.H. *et al.* 1995); infatti, le strategie adottate per minimizzare l'adesione, come ad esempio l'immobilizzazione sulla superficie del materiale di polietilene ossido (PEO) in grado di ridurre l'assorbimento proteico, non si sono dimostrate sufficienti nel prevenire fenomeni trombotici.

1.4.3 Cellule effettrici della risposta infiammatoria

I monociti

I monociti rappresentano circa il 5-10% dei leucociti del sangue periferico e derivano da un precursore mieloide nel midollo osseo (Fogg *et al.*, 2006); essi vengono liberati nel torrente circolatorio e da qui migrano nei tessuti. L'emivita dei monociti nel sangue è relativamente breve, circa un giorno nel topo (Van Furth and Cohn, 1968) e tre giorni nell'uomo (Whitelaw, 1972); ciò è dovuto al fatto che essi si trasformano continuamente in macrofagi o cellule dendritiche (DC) per garantire il mantenimento dell'omeostasi durante l'infiammazione, svolgendo un ruolo critico sia nell'immunità innata che in quella acquisita (Ziegler-Heitbrock, 2000).

Tuttavia, numerosi studi evidenziano che i macrofagi in alcuni organi si auto-rinnovano senza l'introduzione di precursori dal sangue (Gordon and Taylor, 2005). Ad esempio, i macrofagi presenti nei polmoni e nelle vie aeree non vengono rimpiazzati dai monociti del sangue in seguito a procedure di irradiazione in cui si sia avuta cura nel non danneggiare la vitalità dei precursori locali radiosensibili (Tarling *et al.*, 1987); allo stesso modo, la deplezione dei monociti del sangue non influisce sulla quantità dei macrofagi alveolari (Sawyer *et al.*, 1982). Al contrario, la ripopolazione dei macrofagi polmonari con monociti del sangue si osserva soltanto quando viene effettuata l'irradiazione totale del corpo, in seguito alla quale vengono eliminati i precursori locali (Gordon and Taylor, 2005). Quindi, il concetto che i monociti diano luogo ai macrofagi in tutti gli organi del corpo durante un'infiammazione è stato abbandonato.

Recentemente molte ricerche si focalizzano sulla comprensione dei meccanismi e delle molecole coinvolte nel reclutamento dei monociti e nel loro differenziamento in vari tessuti (Imhof and Aurrand-Lions, 2004; Gordon and Taylor, 2005). Il destino differenziativo dei monociti si divide essenzialmente in due strade: molti diventano macrofagi, mentre altri si sviluppano in cellule dendritiche (Leon *et al.*, 2005).

I macrofagi degradano i materiali che ingeriscono (Delamarre *et al.*, 2005), non sono capaci di presentare gli antigeni o iniziare una risposta mediata dalle cellule T (Albert *et al.*, 1998; Jung *et al.*, 2002; Zammit *et al.*, 2005), rilasciano una grande quantità di citochine quando vengono attivati e svolgono un ruolo importante nell'eliminazione a livello locale delle cellule morte nei tessuti infiammati e non

(Savill *et al.*, 2002). Al contrario, le cellule dendritiche hanno una scarsa capacità proteolitica (Delamarre *et al.*, 2005), ma sono in grado di internalizzare gli antigeni, processarli e presentarli tramite le molecole del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) ai linfociti T (Trombetta *et al.*, 2003).

Macrofagi e DCs hanno distinte proprietà migratorie: i macrofagi rimangono più facilmente nei tessuti, le DCs invece migrano dai tessuti periferici agli organi linfoidi per interagire con le cellule T e indurre la risposta immune (Randolph *et al.*, 2005).

Recentemente è stato dimostrato che l'adenosina, un nucleoside endogeno rilasciato nello spazio extracellulare in condizioni di stress metabolico associate ad ischemia, infiammazione e danno cellulare, influenza la maturazione dei monociti umani (Haskò G. *et al.*, 2007). La prima evidenza di ciò è stata la dimostrazione che l'adenosina deaminasi incrementa la sua attività durante gli stadi precoci del differenziamento monocitico, mentre la sua inibizione causa un ritardo nel processo di maturazione di queste cellule (Fischer *et al.*, 1976). Sembra che elevate concentrazioni di adenosina esogena prevengano il differenziamento dei monociti in macrofagi e provochino l'arresto dei monociti in uno stadio in cui sono caratterizzati dall'aver molte funzioni accessorie ed un fenotipo simile a quello delle cellule dendritiche (fig 1.26) (Najar *et al.*, 1990). L'adenosina influenza la maturazione dei monociti anche promuovendo la formazione di cellule giganti multinucleate attraverso la stimolazione del recettore A_1 , mentre l'interazione con A_2 impedirebbe la formazione delle cellule giganti (fig. 1.26) (Merril *et al.*, 1997).

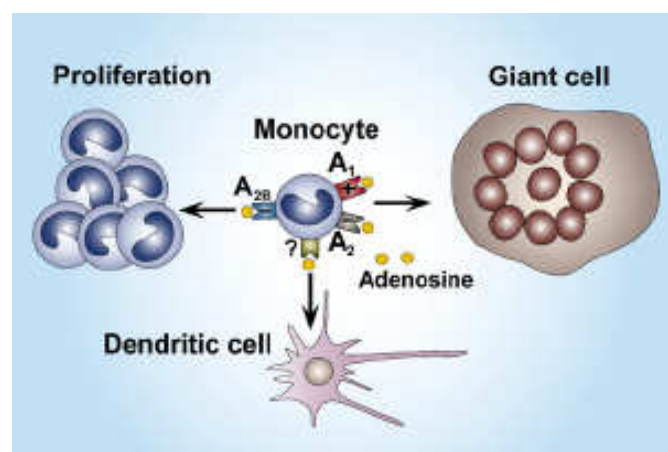


Fig 1.26: effetti dell'adenosina sulla maturazione dei monociti (da Haskò G. *et al.*, 2007).

I meccanismi intracellulari attraverso i quali i recettori adenosinici influenzano la maturazione dei monociti rimangono ancora da chiarire e rappresentano proprio per questo un'importante area di ricerca per il futuro; una conoscenza più profonda della funzione di questi recettori potrebbe portare allo sviluppo di nuove terapie per le malattie infiammatorie (Haskò G. *et al.*, 2007).

Gli eventi trascrizionali che controllano il “*commitment*” dei monociti in macrofagi o cellule dendritiche sono poco conosciuti. Recentemente è stato proposto che il differenziamento in cellule dendritiche potrebbe essere stimolato da elevati livelli del fattore di trascrizione PU.1, appartenente alla famiglia Ets, insieme alla down-regulation del fattore bZip specifico dei monociti/macrofagi (Bakri Y. *et al.*, 2005; Kelly I.M. *et al.*, 2000). Inoltre, esperimenti in vitro hanno dimostrato che il differenziamento dei monociti in macrofagi è associato all'attivazione delle caspasi, che non si osserva nei monociti che diventano DCs. Nei topi la delezione del gene della caspasi-8 nei precursori mielomonocitici blocca la formazione dei macrofagi, senza influire sul numero delle cellule dendritiche e dei granulociti (Kang T.B. *et al.*, 2004). Le caspasi, proteasi aspartato-specifiche, svolgono un ruolo fondamentale nella morte cellulare per apoptosi ma non solo: esse agiscono anche nella maturazione delle citochine, nell'attivazione delle cellule T, nella migrazione e motilità e nel differenziamento cellulare (Launay S. *et al.*, 2005).

La differente espressione di marcatori cellulari come il CD14 (parte del recettore per il lipopolisaccaride) e il CD16 (anche chiamato FcγRIII) ha portato i ricercatori a suddividere i monociti del sangue in due sottoclassi: i cosiddetti “classici” CD14⁺/CD16⁻, che rappresentano più del 95% della popolazione circolante in un individuo sano, e i monociti “non classici” CD14^{low}/CD16⁺ (Passlick B. *et al.*, 1989; Ziegler-Heintbrock H.W. *et al.*, 1993). Queste sottoclassi differiscono in diversi aspetti, compresa l'espressione di diverse molecole d'adesione e di diversi recettori per le chemochine (CCR).

I monociti “classici” esprimono CCR2, CD62L (L-selectina) e FcγRI (CD64), mentre l'altra sottopopolazione manca del CCR2 e presenta un alto livello di MHC-II e di FcγRII (CD32) (Ziegler-Heintbrock H.W. *et al.*, 1993; Weber C. *et al.*, 2000; Geissmann F. *et al.*, 2003; Ancuta P. *et al.*, 2003; Gordon S. e Taylor P.R., 2005). Entrambe le sottoclassi esprimono il recettore per le *fractalkine*, CX3CR1, ma i monociti CD14^{low}/CD16⁺ ne esprimono livelli più elevati (Ancuta P. *et al.*, 2003; Geissmann F. *et al.*, 2003).

Esiste una terza popolazione intermedia tra le due sopra citate, CD14⁺/CD16⁺, che differenzia *in vitro* diversamente dai CD14^{low}/CD16⁺ (Grage-Griebenow *et al.*, 2001) e probabilmente si tratta del subset di monociti CD16⁺ che esprimono CCR5 (Ancuta P. *et al.*, 2003).

L'interesse per i monociti CD16⁺ è in parte alimentato dall'osservazione di un loro aumento nel sangue durante i fenomeni infiammatori ma anche nei soggetti affetti da HIV (Pulliam L. *et al.*, 1997), arterosclerosi (Schlitt A. *et al.*, 2004), artrite reumatoide (Baeten C.L. *et al.*, 2001) e cancro (Saleh M.N. *et al.*, 1995).

Il loro aumento durante la risposta infiammatoria ha fatto presupporre il loro attivo coinvolgimento nel processo ed erroneamente in più lavori si fa riferimento a tale classe chiamandoli monociti infiammatori (Tacke F. and Randolph G.J., 2006).

Tuttavia tale definizione appare inappropriata; nel topo la controparte dei CD16⁺, detta Ly6C⁻/Gr-1^{low}, non migra verso il sito bersaglio in seguito ad infiammazione (Geissmann F. *et al.*, 2003; Sunderkotter C. *et al.*, 2004; Qu C.F. *et al.*, 2004).

Studi *in vitro* hanno dimostrato una certa predisposizione da parte dei monociti CD16⁺ a differenziarsi in cellule dendritiche presentanti l'antigene (Grage-Griebenow E. *et al.*, 2001; Randolph G.J. *et al.*, 2002).

Senza maggiori conoscenze circa la localizzazione *in vivo* di tale sottoclasse di monociti risulta difficile contestualizzare i risultati ottenuti *in vitro*. Capire quale delle diverse sottoclassi di monociti umani differenzino in DC *in vivo* è piuttosto complesso; risulta evidente *in vitro* che un importante ruolo in tale fenomeno è svolto dal fenotipo della coltura monocitaria testata e dai fattori introdotti.

I monociti CD14⁺/CD16⁻, coltivati su un modello modificato di tessuto ingegnerizzato equivalente all'epidermide umana, tendono a differenziarsi in cellule di Langerhans (Schaerli P. *et al.*, 2005), tipiche cellule dendritiche epidermali, caratterizzate da un'importante funzione nel presentare l'antigene.

Al contrario, in assenza di rivestimento epidermale, ma in presenza di cellule vascolari endoteliali, i monociti CD16⁺ diventano DCs (Randolph G.J. *et al.*, 2002).

I macrofagi

Sono una popolazione eterogenea di fagociti mononucleati e si trovano ubiquitariamente in tutto il corpo; svolgono un ruolo importante nell'organizzare ed eseguire diversi processi omeostatici, immunologici ed infiammatori (Mosser, 2003;

Stout & Suttles, 2004). Proprio grazie alla loro distribuzione in diversi tessuti corporei, rappresentano una linea di difesa immediata contro l'attacco di agenti estranei, prima ancora che si verifichi la migrazione dei granulociti neutrofilo nel sito danneggiato. I macrofagi neo-formati, chiamati monociti, originano da cellule staminali progenitrici presenti nel midollo osseo (Naito *et al.*, 1996; Valledor *et al.*, 1998). Dopo aver differenziato, in seguito all'esposizione alle citochine locali come il GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), IL-3 (interleuchina 3) e M-CSF (macrophage colony-stimulating factor), lasciano il midollo osseo ed entrano nel sangue, dove vengono ulteriormente a contatto con una grande quantità di molecole regolatorie (citochine, chemochine, ormoni, acidi grassi, immunoglobuline) che influiscono sulle loro caratteristiche funzionali e fenotipiche (Haskò G. *et al.*, 2007). Dopo una permanenza media in circolo di 1-3 giorni, i monociti trasmigrano attraverso i pori delle cellule endoteliali per "diapedesi" e si infiltrano nei tessuti dove differenziano in macrofagi. Qui assumono caratteristiche tessuto-specifiche indotte da stimoli locali: si ha così una grande varietà di macrofagi tissutali, per ragioni storiche definiti in vario modo (ad es. cellule di Kupffer nel fegato) o con denominazioni che ne indicano la funzione primaria (ad es. cellule microgliali nel tessuto nervoso, osteoclasti nell'osso).

Le funzioni biologiche dei macrofagi attivati sono numerose e ben analizzate (Gordon S., 2003; Mosser D.M., 2003; Stout R.D. e Suttles J., 2004).

Sono gli elementi cruciali della cosiddetta risposta immunitaria innata, inoltre, grazie alla cattura e al processamento degli antigeni, svolto principalmente dalle cellule dendritiche, attivano altri meccanismi di difesa. In particolare, l'esposizione sulla superficie dei fagociti del complesso maggiore d'istocompatibilità, di molecole co-stimolatorie e il contemporaneo rilascio di mediatori come citochine e radicali liberi, inducono l'attivazione dei linfociti (Unanue E.R., 1984), che rappresentano l'elemento specifico della risposta immunitaria e cooperano con i macrofagi nel riconoscere ed eliminare i patogeni. La successiva risoluzione del processo infiammatorio è coordinata da mediatori endogeni attraverso una via altamente organizzata (Duffield J.S., 2003; Gilroy D.W. *et al.*, 2004; Wells C.A. *et al.*, 2005).

Tali fattori bloccano la migrazione dei leucociti verso l'area infiammata, diminuiscono la vasodilatazione e la permeabilità vascolare ed effettuano la rimozione dei neutrofilo, dell'essudato e della fibrina, ristabilendo così l'integrità funzionalità del tessuto infiammato.

Il ruolo dei macrofagi nello sviluppo del tessuto di granulazione e nella guarigione della ferita intorno all'impianto non è stato ancora completamente chiarito e merita ulteriori studi. I macrofagi vivono molto di più rispetto ai leucociti polimorfonucleati (PMN) e si stanziavano nell'interfaccia tessuto-impianto per lunghi periodi di tempo. Alcuni studi clinici hanno dimostrato che la loro permanenza nell'interfaccia con protesi ortopediche, vascolari e cardiovascolari si estende per oltre 15 anni (Miller K.M. and Anderson J.M., 1988).

I macrofagi sono particolarmente ricchi di enzimi lisosomiali e questo spiega la loro capacità di eliminare il materiale organico che ha terminato il proprio ciclo vitale (ad esempio cellule senescenti) o che presenta alterazioni di struttura (ad esempio globuli rossi rivestiti da autoanticorpi) e di degradare i microrganismi ingeriti.

Queste funzioni richiedono l'adesione a cellule mediata dalle molecole CD11b e CD11c, l'adesione alla matrice extracellulare mediata dal recettore per la fibronectina, fenomeni di endocitosi, fagocitosi e *antibody-dependent cell mediated cytotoxicity* (ADCC) mediate dal recettore per il frammento Fc delle IgG monomeriche (FcγRI o CD64) e per il frammento Fc delle IgG modificate a formare immunocomplessi (FcγRIII, CD16).

L'endocitosi e la fagocitosi sono favorite anche dalla presenza sulla membrana dei recettori per le frazioni C3b e C3d del complemento, rispettivamente CR1 (CD35) e CR2 (CD21).

Altri importanti markers macrofagici (fig 1.27) sono il CD14, il CD31, il CD36 e il CD68.

Il CD14 è una glicoproteina di 50-55 kDa ancorata alla superficie macrofagica mediante una molecola di glicosil-fosfatidil-inositolo e rappresenta il recettore per il lipopolisaccaride (LPS) e per la proteina legante l'LPS (*LPS binding protein*) (Grunwald U. *et al.*, 1996), oltre ad essere un marker di differenziamento (Ziegler-Heitbrock HWL *et al.*, 1993). Tale recettore viene utilizzato dai macrofagi nel riconoscimento ed eliminazione delle cellule apoptotiche (Flora P.K. and Gregory C.D., 1994; Devitt A. *et al.*, 1998; Molfatt O.D. *et al.*, 1999; Schlegel R.A. *et al.*, 1999). Il CD14 ha la capacità di interagire con i fosfolipidi (Yu B. *et al.*, 1997; Wang P.Y. *et al.*, 1998; Wang P.Y. and Munford R.S., 1999; Sugiyama T. and Wright S.D. 2001) e sfrutta tale capacità per riconoscere e legare la fosfatidilserina (PS) espressa sulla superficie delle cellule apoptotiche (Devitt A. *et al.*, 2003).

E' necessario ricordare che l'apoptosi rappresenta un possibile meccanismo per modulare la presenza e l'attività delle cellule aderenti al biomateriale e quindi, in ultima analisi, per influenzare l'esito dell'impianto

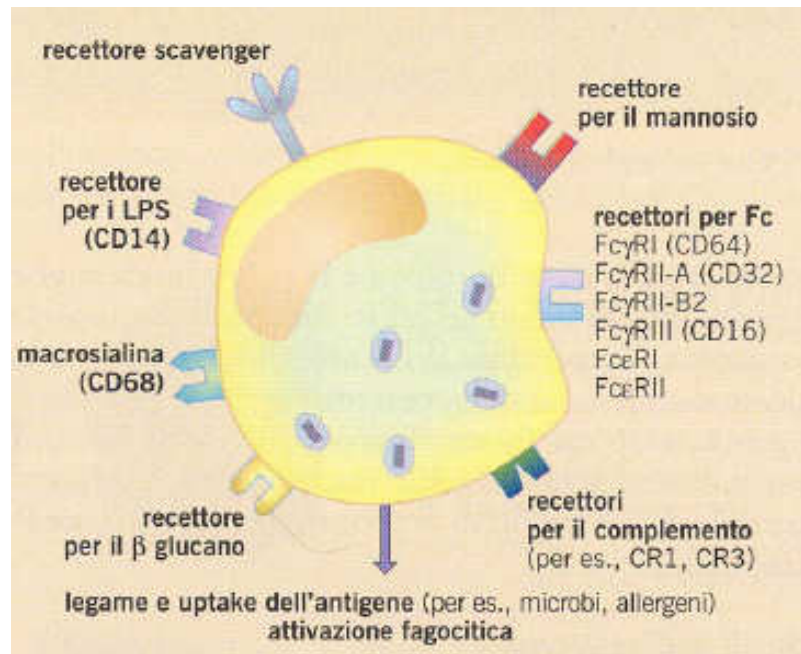


Fig. 1.27: alcuni dei diversi recettori espressi sulla superficie dei monociti/macrofagi.

E' stato dimostrato che la chimica di superficie influenza lo strato di proteine assorbite che, interferendo con l'espressione genica monocitaria, regola non solo l'adesione e l'attivazione ma anche il processo apoptotico (Brodbeck W.G. *et al.* 2002). In particolare, un ruolo rilevante nell'induzione di apoptosi è stato attribuito al TNF- α , mentre IL-4 è stata individuata come principale agente responsabile della resistenza all'apoptosi. Il meccanismo d'azione di IL-4 infatti, da una parte, comporta una diminuzione nella produzione di TNF- α e dall'altra favorisce la fusione dei macrofagi in FBGCs, fenomeno osservato in correlazione con una riduzione del livello apoptotico delle cellule aderenti (Brodbeck W.G. *et al.* 2001). Inoltre, la fagocitosi delle cellule apoptotiche sopprime il rilascio di mediatori dell'infiammazione, inducendo la secrezione della citochina proinfiammatoria IL-10 (Gretzer C *et al.*, 2002).

In letteratura, il ruolo dell'apoptosi in associazione all'impianto di biomateriali è controverso. Per la maggior parte degli autori questa potrebbe avere un ruolo nettamente positivo se intesa come un meccanismo che consente di ottenere un aumento della biostabilità *in vivo* dei materiali impiantati (Brodbeck W.G. *et al.* 2001). Altri autori, al contrario, assumono una posizione totalmente opposta ritenendo l'apoptosi dei monociti aderenti un processo deleterio per la buona riuscita dell'impianto; l'eliminazione di fagociti al livello della sede di impianto comporterebbe, in effetti, un abbassamento delle difese dell'organismo ospite da eventuali infezioni batteriche (Shive M.S. *et al.*, 2002).

Il CD36 è una glicoproteina di membrana espressa negli stadi tardivi del differenziamento macrofagico, ma anche in altri tipi cellulari ossia cellule endoteliali della microvascolatura, eritrociti, piastrine e cellule del tessuto epiteliale mammario (Greenwalt D.E. *et al.*, 1992). Si tratta di un polipeptide di 53 kDa che svolge diverse funzioni, a seconda del tipo di cellula da cui viene espresso; ad esempio nelle piastrine agisce come recettore per le proteine della matrice extracellulare collagene e trombospondina, mentre negli eritrociti infettati dal *Plasmodium falciparum* media l'adesione alle cellule endoteliali dei capillari, un fenomeno che contribuisce alla mortalità per malaria negli uomini.

Recentemente è stato scoperto che il CD36 macrofagico è coinvolto nella fagocitosi di neutrofili e linfociti T apoptotici, agisce da recettore per le lipoproteine ossidate di bassa densità e per gli acidi grassi. La regolazione dell'espressione di CD36 durante il differenziamento monocitico in termini di attivazione genica, di modificazioni post-trascrizionali e post-trasduzionali e di trasporto intracellulare non sono state ancora del tutto chiarite; nelle linee cellulari monocitarie l'espressione di CD36 viene indotta con gli esteri del forbolo, anche se si riscontrano cinetiche differenti in base al tipo di linea utilizzata: ciò indica che la regolazione dipende dallo stadio differenziativo cellulare (Alessio M. *et al.*, 1996).

Il CD31 (*Platelet Endothelial Cell Adesion Molecole-1*, PECAM-1) viene espresso soprattutto dalle cellule endoteliali, ma la sua espressione è ben documentata anche nei macrofagi. La sua funzione principale è quella di mediare l'adesione cellula-cellula; un recente studio ha dimostrato la sua presenza nei macrofagi intratumorali, rendendolo un potenziale marker diagnostico per il sarcoma vascolare (McKenney J.K. *et al.*, 2001).

Il CD68 o macrosialina è una proteina macrofagica altamente glicosilata localizzata a livello intracellulare, precisamente nella membrana dei lisosomi; essa infatti appartiene alla famiglia delle proteine LAMP (*Lysosomal-Associated Membrane Glycoprotein*). E' stato dimostrato che le sue proprietà funzionali sono associate a cambiamenti nel grado di glicosilazione (da Silva R.P. *et al.*, 1999); riveste un ruolo importante nella fagocitosi specializzata da parte dei macrofagi tissutali, sia nel metabolismo lisosomale intracellulare, che a livello extracellulare nelle interazione cellule-cellula e cellula-patogeno (Holness C.L. *et al.*, 1993).

Presumibilmente lo stadio differenziativo terminale dei macrofagi, peraltro non obbligatorio, è rappresentato dalle cellule giganti multinucleate che si osservano nel tessuto di granulazione.

La formazione delle MGC coinvolge diverse molecole tra cui IL-4 e fattori come TREM2, CD44 e il recettore nucleotidico P₂X₇ (Lemaire L. *et al.*, 2006).

In risposta alle diverse citochine e ai diversi prodotti liberati durante un'infezione, i fagociti mononucleati esprimono diverse proprietà funzionali ed una diversa polarizzazione (Gordon S., 2003; Gordon S. and Taylor P.R., 2005; Meghari S. *et al.*, 2007; Helming L. and Gordon S., 2007).

È per questo che si tende a classificare i macrofagi in cellule M1 o M2 (fig. 1.28), quasi per rispecchiare la nomenclatura che distingue i linfociti T CD4 in Th1 (infiammatori, attivano i macrofagi) e Th2 (adiuvanti, attivano le cellule B). La classica attivazione dei macrofagi M1 è guidata da INF- γ da solo o in aggiunta a stimoli microbiali (es. LPS) o ancora in presenza di citochine (es. TNF- α e GM-CSF). IL-4 e IL-13 non sono solo semplici inibitori dell'attivazione macrofagica in senso M1, ma anzi inducono l'attivazione in senso M2 (Meghari S. *et al.*, 2007).

Con il nome M2 si vuole descrivere tutti quei macrofagi che non hanno subito la classica attivazione M1, ossia quelli attivati dall'esposizione a IL-4 o IL-3, immunocomplessi, IL-10, glucocorticoidi o ormoni secosteroidi (Gordon S., 2003; Gordon S. e Taylor P.R., 2005).

Si è visto recentemente che l'activina A e IL-21 inducono un'attivazione macrofagica in senso M2 (Gallina G. *et al.*, 2006; Kzhyshkowska J. *et al.*, 2006; Ogawa K. *et al.*, 2006; Pesce J. *et al.*, 2006).

Un ruolo importante nella diversa polarizzazione macrofagica è anche svolto dal recettore per le chemochine CCR4; i macrofagi CCR4^{-/-} sono indirizzati verso la polarizzazione M2 (Ness T.L. *et al.*, 2006).

In generale le cellule M1 e le varie forme di M2 hanno chemochine e recettori per chemochine differenti (Mantovani A. *et al.*, 2004).

Le cellule M1 hanno un fenotipo $IL-12^{high}$, $IL-23^{high}$, $IL-10^{low}$. Sono efficienti produttori di molecole effettrici (reattivi dell'ossigeno e intermedi dell'azoto) e citochine infiammatorie ($IL-1\beta$, $TNF-\alpha$, $IL-6$), inoltre partecipano come induttori ed effettori nella polarizzazione dei linfociti T CD4 *naive* in senso Th1 e mediano la resistenza contro parassiti intracellulari e tumori (Mantovani A. *et al.*, 2007).

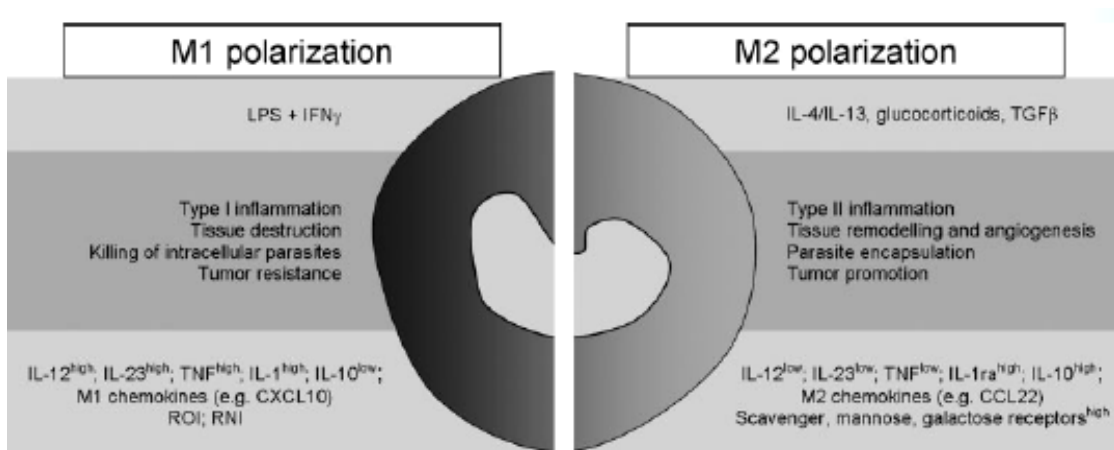


Fig. 1.28: la diversa polarizzazione macrofagica. A sinistra il classico differenziamento in senso M1, a destra quello in senso M2. Sono anche riportati i maggiori effetti sulla funzione del macrofago, oltre ai marcatori molecolari ed effettori. (ROI: intermedi reattivi dell'ossigeno; RNI: intermedi reattivi dell'azoto) (da Mantovani A. *et al.*, 2007).

Le varie forme di macrofagi M2 mostrano un fenotipo $IL-12^{low}$, $IL-23^{low}$, $IL-10^{high}$ e possiedono una capacità variabile di produrre citochine in relazione al segnale utilizzato per l'attivazione. Hanno generalmente alti livelli di *scavenger*, recettori mannosio e galattosio-*type*; inoltre il metabolismo dell'arginina è spostato verso la produzione di ornitina e poliamina (Mantovani A. *et al.*, 2007).

Esistono alcune differenze anche per quel che riguarda le componenti del sistema regolatorio dell'IL-1: i macrofagi M2 esprimono bassi livelli di $IL-1\beta$ e di caspasi-1 e alti livelli di $IL-1ra$ e del recettore IL-1 di tipo II, le cellule M1 l'esatto contrario (Mantovani A. *et al.*, 2007).

I macrofagi polarizzati in senso M2 svolgono diverse funzioni: partecipano alla polarizzazione dei linfociti T CD4 *naive* indirizzandoli verso la forma Th2, promuovono l'uccisione e l'incapsulamento dei parassiti (Noel W. *et al.*, 2004), sono

presenti nei tumori e ne promuovono la progressione (Wynn T.A., 2004), hanno funzioni immuno-regolatorie (Gordon S., 2003).

Stabilin-1 (STAB-1) è un recettore *scavenger* espresso nei macrofagi M2; esso lega una proteina della matrice cellulare, SPARC, e ne media l'eliminazione (Kzhyshkowska J. *et al.*, 2006). Ciò aggiunge ulteriori elementi riguardo la connessione tra i macrofagi M2 e il rimodellamento della matrice extracellulare nei tessuti normali e tumorali (Sangaletti S. *et al.*, 2003).

Studi di espressione genica hanno chiarito il panorama di geni coinvolti nella polarizzazione macrofagica, tra cui Fizz e YM-1 (Takahashi H. *et al.*, 2004; Ghassabeh G.H. *et al.*, 2005; Desnues B. *et al.*, 2005; Martinez F.O. *et al.*, 2006; Biswas S.K. *et al.*, 2006).

Meghari *et al* (2007) hanno recentemente riportato che il gene Vanin-1 controlla la formazione del granuloma e la polarizzazione macrofagica durante l'infezione da *Coxiella burnetii*, un batterio che sopravvive nei macrofagi, causando la febbre Q nell'uomo; Vanin-1 è un enzima che controlla i livelli di glutatione e lo stato ossido-riduttivo cellulare attraverso il rilascio di cisteamine.

I risultati ottenuti da Meghari sono in linea con i precedenti dati che affermavano l'importanza dello stato ossido-riduttivo nella polarizzazione macrofagica (Zhu Z. *et al.*, 2004).

Le cellule M2 esprimono alti livelli della proteina chitinasi-simile, YM-1. Le chitinasi rappresentano una strategia anti-parassitaria conservata durante l'evoluzione ed è ormai evidente come la chitinasi acidica dei mammiferi, indotta da IL-13, sia un importante mediatore della risposta infiammatoria (Zhu Z. *et al.*, 2004).

Cellule dendritiche

Le cellule dendritiche sono cellule presentanti l'antigene (APC) e come tali sono specializzate nella "cattura" e nella processazione di antigeni (Ag) in frammenti peptidici che sono successivamente complessati con le molecole del sistema MHC e presentati alle cellule T per iniziare la risposta immunitaria.

Esse hanno la peculiare capacità di stimolare non solo cellule T-memoria ma soprattutto linfociti T CD4 *naive*. Quindi, le DC hanno un ruolo centrale come "coadiuvanti naturali" per l'induzione di una risposta immune Ag-specifica.

Le DC sono cellule distribuite ubiquitariamente nel corpo umano, particolarmente nei tessuti che fungono da barriera con l'ambiente circostante (per esempio, le cellule di Langerhans nella cute e a livello delle mucose) e negli organi linfoidi (DC interdigitate), dove agiscono come “sentinelle” nei confronti degli agenti patogeni con cui l'organismo entra in contatto.

Stimoli infiammatori, come TNF- α e IL-1 β , batteri, prodotti batterici (LPS) e virus, inducono la migrazione delle cellule dendritiche, che hanno “caricato” l'antigene, dai tessuti periferici agli organi linfoidi secondari. Durante la migrazione, le DC subiscono un processo di maturazione, che le porta ad incrementare enormemente la propria capacità di attivare le cellule T (fig. 1.29). Questo processo consiste nell'aumentata espressione di membrana di alcune molecole chiave nell'interazione tra APC e linfocita: molecole di adesione, molecole del sistema HLA e molecole di costimolazione (Bancherau J. *et al.*, 1998; Metha Damani A., 1994).

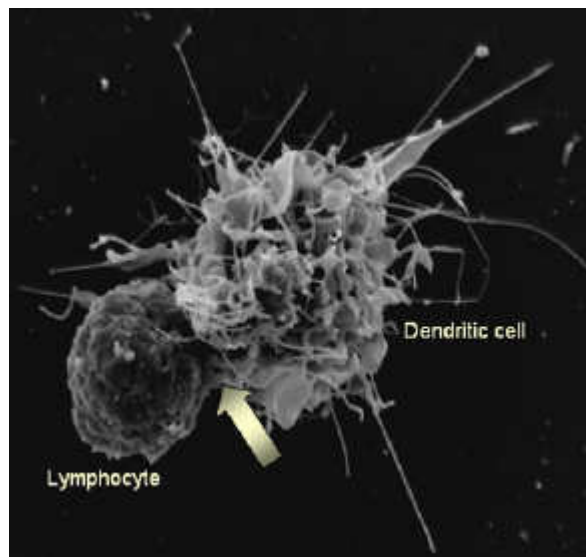


Fig. 1.29: attivazione del linfocita T da parte di una DC: la cellula dendritica matura prende contatto con un linfocita (www.pathmicro.med.sc.ed.)

L'attività funzionale delle DC deriva da una serie di caratteristiche peculiari di queste cellule. La loro forma, caratterizzata da numerose estroflessioni citoplasmatiche, e l'elevata espressione di membrana di alcune molecole di adesione ed integrine (LFA-3, ICAM-1, ICAM-3) estendono l'area di contatto con le cellule effettrici del sistema immunitario. Le DC esprimono intensamente gli antigeni HLA di classe II (HLA-RD,-DQ,-DP) e le molecole di costimolazione (CD80, CD86,

CD40), le quali interagendo con il proprio ligando presente sui linfociti T (CD28, CTLA-4, CD40L), forniscono il “secondo segnale”, indispensabile per indurre al momento del riconoscimento antigenico una risposta proliferativa (Bancherau J. *et al.*, 1998).

Inoltre, le DC producono un vasto numero di citochine, tra cui IL-12, che ha la funzione di promuovere una risposta immunitaria di tipo citotossico attraverso la differenziazione delle cellule Th0 in cellule Th1, produttori interferon (IFN)- γ e IL-2 (Macatonia S.E. *et al.*, 1995; Cella M. *et al.*, 1996).

Recentemente è stato dimostrato che, durante il riconoscimento antigenico, i linfociti T-helper attivano le DC mediante l'interazione CD40-CD40L e le DC così attivate sono capaci di stimolare una risposta T-killer (Bennet S.R.M. *et al.* 1998; Ridge J.P. *et al.*, 1998; Schoenberger S.P. *et al.*, 1998).

Le DC si trovano nei tessuti periferici in uno “stato immaturo” e sono incapaci di attivare i linfociti T perchè mancano di tutti i segnali di membrana necessari per la loro attivazione. A questo livello di differenziazione, tuttavia, sono estremamente efficienti nel catturare antigeni solubili, antigeni particolati e microorganismi mediante fagocitosi, macropinocitosi e attraverso il recettore macrofagico del mannosio ed i recettori Fc γ e Fc ϵ (Bancherau J. *et al.*, 1998).

La cattura dell'antigene induce le DC a maturare e ad esprimere più intensamente sulla membrana cellulare le molecole MHC e quelle di costimolazione, nonché gli antigeni associati al differenziamento in senso dendritico (CD83 e p55). Nel contempo, viene progressivamente perduta la capacità di catturare e processare l'antigene. Tuttavia, la completa attivazione delle DC dipende dal contatto con le cellule T attraverso l'interazione CD40-CD40L, che induce la produzione di IL-12.

Pertanto, le funzioni principali delle DC (cattura dell'antigene, attivazione dei linfociti T) sono rigidamente associate a stadi successivi di differenziamento. A questo proposito, è interessante notare come IL-10 (Kock F. *et al.*, 1996) e il *vascular endothelial growth factor* (VEGF), secreto dalle cellule neoplastiche (Gabrilovich D.I. *et al.*, 1996), ostacolano la maturazione delle DC, inibendo l'efficace attivazione delle cellule T.

Evidenze recenti in modelli sperimentali e nell'uomo hanno mostrato il potenziale ruolo delle DC in strategie di immunizzazione dirette a stimolare un'immunità specifica antitumorale.

I linfociti

Il ruolo dei linfociti nella risposta biologica ai polimeri sintetici è poco conosciuto, nonostante sia stata dimostrata la loro presenza, seppur transiente, nel sito di impianto del biomateriale (Chang D.T. *et al.*, 2008).

Nelle co-culture di linfociti e macrofagi, i linfociti aderenti sono associati prevalentemente ai macrofagi piuttosto che alla superficie del biopolimero; ciò sta ad indicare il verificarsi di interazioni molecolari tra i due tipi di cellule (interazioni giustacrine). Esperimenti in vitro hanno dimostrato che tali interazioni stimolano l'adesione e la fusione dei macrofagi, così come la proliferazione dei linfociti attraverso meccanismi paracrini (Brodbeck W.G. *et al.*, 2005).

La popolazione dei linfociti, costituita da linfociti T (cellule T), linfociti B (cellule B) e dalle cellule natural killer (NK), risponde agli stimoli infiammatori utilizzando vari meccanismi d'azione. Le cellule B sono coinvolte nel riconoscimento di corpi estranei e nella produzione degli anticorpi per l'eliminazione degli antigeni. Le cellule NK inducono l'apoptosi delle cellule bersaglio. I linfociti T, che rappresentano la percentuale maggiore, sono divisi in due sottopopolazioni, i CD8⁺ "citotossici" e i CD4⁺ "helper". I CD8⁺ distruggono le cellule infettate da microrganismi intracellulari con meccanismo simile a quello utilizzato dalle NK; i CD4⁺ sono a loro volta suddivisi in Th1, che attivano i macrofagi che hanno fagocitato, e Th2 che inducono l'attivazione dei linfociti B a produrre anticorpi diretti contro microrganismi extracellulari.

Queste cellule T possono comunicare con altri tipi di cellule attraverso il rilascio di fattori solubili come le citochine (Chang D.T. *et al.*, 2008).

I linfociti T interagiscono con i macrofagi che, dopo aver fagocitato e processato il materiale estraneo, lo presentano ad essi; come risultato di ciò, i linfociti T stimolati producono IL-2 che media la loro attivazione e proliferazione. L'attivazione cellulare determina la secrezione di altre molecole effettrici; ad esempio, le cellule T di tipo Th1 producono INF- γ , IL-2 e TNF- β , mentre le Th2 producono IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 (Romagnani S., 1999). Inoltre, l'attivazione dei macrofagi da parte dei linfociti innesca la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), ossido nitrico (NO), IL-1 β e TNF- α (Romagnani S., 1999; Burger D *et al.*, 2002).

I linfociti T e i macrofagi non sono solo capaci di attivarsi gli uni con gli altri; essi esercitano anche effetti soppressivi sulla risposta immune. Ad esempio, l'interazione

del TCR (T-cell receptor) con il complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) sui macrofagi, in assenza di un segnale costimolatorio secondario, può rendere i linfociti T inattivi (anergia) e impedirne la proliferazione (Roncarolo M.G. *et al.*, 2001). Inoltre, i macrofagi possono guidare il differenziamento di cellule T regolatorie capaci di sopprimere attivamente la risposta immune attraverso l'espressione di molecole di superficie inibitorie o attraverso la produzione di IL-10 e TGF- β (Hoves S. *et al.*, 2006).

E' noto che le proprietà fisico-chimiche dei materiali influenzano in modo significativo l'adesione e l'attivazione monocitaria, che a loro volta si sono dimostrate capaci di influenzare l'attività linfocitica a lungo termine (MacEwan M.R. *et al.* 2005).

1.4.4 Mediatori chimici della risposta immune

Le citochine

Le citochine sono piccole proteine solubili (15-30 kDa) prodotte dalle cellule dell'immunità innata e adattativa in risposta all'aggressione da parte di microrganismi o antigeni estranei all'ospite. Esse intervengono, oltre che nella fase attivatoria, stimolando la crescita, la maturazione e la differenziazione delle componenti cellulari, anche nelle fasi effettrici della risposta immune, regolando l'infiammazione, la produzione anticorpale e l'eliminazione dell'antigene.

Le citochine svolgono un'azione "pleiotropica"; questo termine si riferisce alla capacità di una singola citochina di agire su differenti tipi cellulari e produrre effetti biologici multipli. Un altro aspetto che caratterizza la funzionalità del sistema citochinico è la sua "ridondanza", vale a dire la proprietà di differenti citochine di determinare lo stesso effetto funzionale. Le citochine, inoltre, possono interagire tra loro antagonizzandosi, oppure avere effetto additivo o sinergico (vale a dire un risultato maggiore della somma degli effetti di ciascuna delle due).

La maggior parte delle citochine svolge la propria azione localmente, nel punto di produzione. L'effetto biologico può riguardare la stessa cellula produttrice (effetto autocrino), oppure cellule vicine (effetto paracrino). Quando prodotte in grande quantità, in seguito ad un'intensa attivazione immunologica, le citochine possono

passare nella circolazione sistemica ed agire a distanza dal sito di produzione (effetto endocrino) (fig 1.30).

Da un punto di vista funzionale le citochine vengono classificate in mediatori dell'immunità innata, mediatori dell'immunità specifica e fattori di crescita del sistema ematopoietico. I recettori per le citochine a loro volta possono essere raggruppati in cinque famiglie, in base all'omologia strutturale tra i domini extracellulari.

Alcune proteine recettoriali sono membri della super-famiglia delle immunoglobuline, altre fanno parte della categoria dei recettori ematopoietici, altri sono membri del gruppo dei TNF e, infine, un gruppo appartiene alla famiglia dei recettori delle chemochine.

Ciascuna famiglia recettoriale è diversa dalle altre e ciascun membro all'interno di una famiglia è una variante proteica con caratteristiche strutturali proprie e capace di indurre una determinata funzione nella cellula che lo espone.

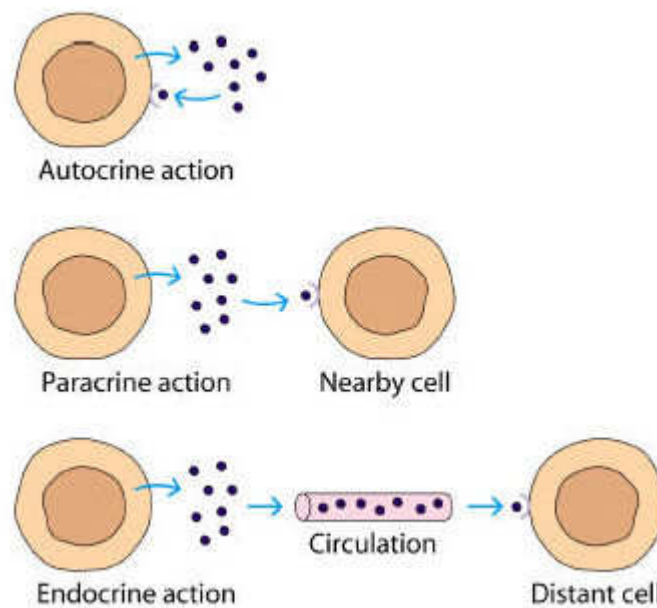


Fig. 1.30: meccanismi d'azione delle citochine.

Nella famiglia dei recettori ematopoietici la catena α spesso è responsabile per la specificità del legame con la citochina, mentre la catena β è responsabile della

trasduzione del segnale. Nel gruppo dei TNF, i ligandi possono rimanere associati alla membrana piuttosto che essere secreti (Abbas A.K. 2000).

Fattore di necrosi tumorale (TNF- α)

E' il principale mediatore della risposta dell'ospite ad agenti infettivi batterici gram negativi ed è responsabile di gran parte delle complicazioni sistemiche che fanno seguito a gravi infezioni. Viene prodotto dai fagociti mononucleati attivati (soprattutto da LPS), ma anche da linfociti T attivati, cellule NK e mastociti.

Questa citochina è codificata da un singolo gene localizzato nell'uomo sul cromosoma 6, all'interno del locus MHC. Essa svolge la sua azione legandosi a due distinti recettori con differente peso molecolare, rispettivamente di 55 kDa (recettore tipo I, TNF-RI) e 75 kDa (recettore tipo II, TNF-RII), presenti sulla membrana della maggior parte dei tipi cellulari.

L'interazione del TNF con i propri recettori sulla cellula *target* può avere come effetto finale l'attivazione di fattori nucleari di trascrizione, in particolare NF- κ B e AP-1, oppure l'induzione di un processo apoptotico mediato dall'attivazione delle caspasi; recentemente è stato dimostrato che il TNF è responsabile dell'apoptosi dei macrofagi aderenti alla superficie del biomateriale (Brodbeck W.G. *et al.*, 2002).

Il meccanismo molecolare che determina il diverso tipo di risposta cellulare al TNF non è stato ancora completamente chiarito; esso sembra comunque dipendere dalla trasmissione di specifici segnali intracellulari da parte di differenti proteine adattatrici (*adapter proteins*) legate alla porzione citoplasmatica del recettore. Quando prodotto in piccole quantità (concentrazione plasmatica $<10^{-9}$), il TNF esercita un'azione locale pro-infiammatoria, con attivazione leucocitaria ed endoteliale. In particolare, le cellule endoteliali vengono stimulate ad aumentare l'espressione di molecole di adesione (E-selectina e P-selectina) che costituiscono i ligandi per le integrine leucocitarie. Le cellule endoteliali e i fagociti mononucleati sono stimolati a produrre anche chemochine, favorendo in tal modo la chemiotassi dei leucociti ed il loro reclutamento nel sito di infiammazione. L'azione locale sui fagociti mononucleati si esercita anche attraverso l'induzione della produzione di IL-1, i cui effetti biologici, simili a quelli del TNF, amplificano con effetto a cascata l'azione di quest'ultima citochina (Dinarello C.A. *et al.* 1986). Le azioni del TNF sui

leucociti e sull'endotelio sono essenziali per lo sviluppo di un'efficace risposta infiammatoria localizzata. Infatti, come dimostrato in animali da esperimento privati del gene per il TNF (*topi knockout*), oppure trattati con anticorpi neutralizzanti anti-TNF, un'inadeguata disponibilità di questa citochina rende impossibile una delimitazione del processo infettivo.

D'altra parte, in corso di gravi infezioni, la produzione di TNF aumenta significativamente, fino a raggiungere concentrazioni plasmatiche $>10^{-7}M$, con la comparsa di manifestazioni sistemiche quali febbre, produzione di proteine epatiche di fase acuta, coagulazione intravascolare, ipoglicemia, disfunzione della contrattilità miocardica, ipotensione e shock (Feldman A.M. *et al.* 2000). Queste complicazioni si ritrovano associate in quella che viene definita sindrome da shock settico (o shock endotossico), osservata in corso di gravi sepsi da germi gram-negativi e dovuta alla produzione massiva, indotta da LPS, di TNF e altre citochine (quali IL-12, IL-1 e IFN- γ). In tal caso la misurazione dei livelli plasmatici di TNF può essere utile per il monitoraggio della malattia.

Interleuchina 1

L'IL-1, come il TNF, esercita la sua azione nella regolazione della risposta immune innata e nell'infiammazione. Entrambi sono considerati potenti markers di attivazione macrofagica indotta dal contatto con biopolimeri, soprattutto a causa dei loro effetti associati alla guarigione del tessuto danneggiato in seguito all'impianto del biomateriale (Miller K.M. and Anderson J.M., 1988).

IL-1 viene prodotta, oltre che dai fagociti mononucleati, anche da altri tipi cellulari quali neutrofili, cheratinociti, linfocitiB stimolati, fibroblasti e cellule endoteliali.

Esistono due forme principali di IL-1 denominate IL-1 α e IL-1 β , prodotte da due geni diversi, ma con attività biologiche e legami recettoriali identici.

Entrambe le citochine, sintetizzate come precursori polipeptidici di 33 kDa (con omologia strutturale tra le due forme minore del 30%), sono secrete dalle cellule come proteine mature di 17 kDa.

L'IL-1 β esercita la sua funzione biologica soltanto nella forma a più basso peso molecolare, mentre l'IL-1 α è attiva in entrambe le forme. L'azione di clivaggio proteolitico sulla forma originaria di IL-1 β , al fine di produrre la forma biologicamente attiva della citochina, avviene ad opera di una proteasi cisteinica,

appartenente alla famiglia delle caspasi, chiamata enzima di conversione dell'IL-1 β (ICE, *IL-1 β converting enzyme*). La maggior parte di IL-1 presente in circolo è rappresentata da IL-1 β .

Sono stati caratterizzati due differenti recettori di membrana per l'IL-1, entrambi appartenenti alla superfamiglia delle immunoglobuline. Il recettore di tipo I, espresso su quasi tutti i tipi cellulari, è quello che media gran parte degli effetti biologici della citochina. Il recettore di tipo II, presente costitutivamente sui B linfociti e inducibile su altri tipi cellulari, non è coinvolto nella trasmissione dei segnali intracellulari dell'IL-1, ma semplicemente inibisce in maniera competitiva il legame dell'IL-1 al recettore di tipo I. La porzione intracitoplasmatica del recettore per l'IL-1 mostra omologie con quella dei *Toll like receptor*, presenti sulla superficie delle cellule fagocitiche e coinvolti nella risposta immune verso le infezioni batteriche. Come nel caso del TNF, anche il legame dell'IL-1 al recettore di tipo I, porta all'attivazione dei fattori nucleari di trascrizione NF-kB e AP-1.

Gli effetti biologici dell'IL-1 sono simili a quelli del TNF e anch'essi dipendono dalla quantità di citochina prodotta. Infatti, a basse concentrazioni, l'effetto principale dell'IL-1 è quello di agire sulle cellule endoteliali e favorirne l'espressione di molecole superficiali coinvolte nell'adesione leucocitaria e nel processo coagulativo. Quando secreta in quantità elevate, l'IL-1 entra in circolo con effetti sistemici simili a quelli causati dal TNF. Inoltre, IL-1 a basse concentrazioni regola la crescita dei fibroblasti, ne stimola la proliferazione e la produzione di collagene, controllando così la durata e l'estensione della risposta fibrotica al materiale impiantato (Miller K.M. and Anderson J.M., 1988).

L'IL-1 è l'unica citochina verso la quale siano stati identificati degli inibitori naturali. Il più noto di questi è l'antagonista recettoriale dell'IL-1 (IL-1ra, *IL-1 receptor antagonist*), il quale viene secreto dai fagociti mononucleati e si lega al recettore dell'IL-1 comportandosi come inibitore competitivo della citochina (Abbas A.K. 2000).

Interleuchina 6

Viene sintetizzata dai fagociti mononucleati, dalle cellule endoteliali, dai fibroblasti e da altri tipi cellulari in seguito a stimolazione citochinica, soprattutto da parte dell'IL-1 e del TNF.

La forma funzionalmente attiva dell'IL-6 è rappresentata da una proteina di 26 kDa. Questa si lega ad una struttura recettoriale complessa costituita da una proteina di legame di 60 kDa e da una sub-unità di 130 kDa (gp130) deputata alla trasduzione intracellulare del segnale. L'effetto dell'IL-6 sul sistema dell'immunità innata è quello di stimolare la sintesi di proteine di fase acuta (proteina C reattiva, fibrinogeno, ecc.) da parte del fegato e così contribuire agli effetti sistemici della risposta di fase acuta. L'IL-6 costituisce anche un fattore di crescita per i linfociti B in uno stadio avanzato della loro sequenza maturativa, favorendone la differenziazione in cellule produttrici anticorpi.

Interleuchina 8

Appartiene alla famiglia di chemochine CXC e riveste un ruolo importante nella modulazione di numerose funzioni biologiche nelle cellule endoteliali contenenti i recettori CXCR1 e CXCR2. Le chemochine fanno parte di una super-famiglia di proteine a basso peso molecolare (8-13 kDa), divise in quattro gruppi (CC, CXC, CX3C, XC), a seconda della configurazione delle prime due cisteine (Fernandez E.J. *et al.*, 2002). IL-8 agisce in modo diretto, promuovendo la sopravvivenza delle cellule endoteliali e stimolando la produzione di metalloproteinasi della matrice che regolano l'angiogenesi. Inoltre, quando si verifica un danno alla parete degli endoteli vasali, come per esempio in seguito all'impianto di un biomateriale, IL-8 accelera il reclutamento di neutrofili e di linfociti T nell'area sub-endoteliale, stimola l'adesione dei monociti all'endotelio (Gerszten R.E. *et al.*, 1999) e regola la migrazione delle cellule muscolari lisce dei vasi (Yue T.L. *et al.*, 1994). Sembra che IL-8 sia legata alla reazione trombotica all'impianto; infatti, numerosi studi (Ueno A *et al.*, 1996; Okada M. *et al.*, 2006) hanno dimostrato che la trombina incrementa l'espressione di IL-8 da parte delle cellule endoteliali, aumentando lo stato infiammatorio.

Interleuchina 10

Omodimero di 34 kDa prodotto prevalentemente dai macrofagi attivati (un esempio di feedback negativo, dal momento che la sua azione si esplica proprio sulle funzioni macrofagiche), ma anche da cheratinociti e linfociti T. Differisce dalle citochine trattate finora in quanto la sua azione sulla risposta immune è principalmente

inibitoria. In particolare, essa inibisce la produzione di IL-12 e TNF, come pure l'espressione di molecole costimolatorie e di MHC-II da parte dei macrofagi. Pertanto, poichè l'IL-12 è essenziale per la secrezione di IFN- γ , l'effetto inibitorio dell'IL-10 si estende anche sulle risposte immuni cellulo-mediate dirette verso microrganismi intracellulari (Trinchieri G. 1997).

Di significato un po' oscuro appaiono altre sue funzioni come l'induzione dell'apoptosi, lo stimolo alla proliferazione e l'attivazione dei linfociti B.

Uno studio recente (Chang D.T. *et al.*, 2008) ha dimostrato che le superfici dei biomateriali con caratteristiche di idrofilicità e cationicità promuovono la produzione di IL-10 e della metalloproteinasi 9 (MMP-9), rispetto alle stesse superfici idrofiliche neutre o anioniche; quest'ultime promuovono risposte proinfiammatorie e riducono la degradazione della matrice extracellulare, mentre le prime inducono una risposta antinfiammatoria ed un potenziale disfacimento della ECM, facilitando la migrazione cellulare attraverso la matrice e la conseguente progressione da uno stato anti-infiammatorio verso la fase di guarigione del tessuto danneggiato (fase di rimodellamento della matrice).

Radicali liberi dell'ossigeno (ROS) e ossido nitrico (NO)

Il rilascio di specie reattive dell'ossigeno da parte dei neutrofili attivati dall'esposizione al materiale impiantato è un ben noto meccanismo di difesa nei confronti di uno stimolo infiammatorio. Il radicale rilasciato in quantità maggiori è l'anione superossido (O_2^-), che viene prodotto dalla NADPH ossidasi a partire da ossigeno e NADPH (Babior BM *et al.*, 2002). E' stato dimostrato che una prolungata esposizione ai biomateriali determina un rallentamento della catena respiratoria (Giridhar G. *et al.*, 1995; Kaplan SS *et al.*, 1992; Hoffstein ST *et al.*, 1985); ciò compromette la risposta a stimoli battericidi associati all'impianto (ad esempio la comune infezione da *Staphylococcus epidermidis*) perché la prematura attivazione dei neutrofili da parte dei biomateriali determina l'esaurimento delle risorse ossidative cellulari per il continuo rilascio di O_2^- .

Recentemente è stato individuato un altro importante mediatore citotossico dell'infiammazione acuta e cronica, l'ossido nitrico (NO), il cui aumento si osserva in pazienti con sepsi, endotossinemia (ossia la presenza nel sangue di endotossine derivate da batteri gram-negativi), reazioni a corpi estranei (Anstey NM *et al.*, 1996;

Ochoa JB, 1991; Langrehr JM *et al.*, 1992). Clinicamente si è riscontrato un aumento, nel corso dell'infezione, dei livelli di NO misurati sottoforma di nitriti e nitrati nel siero e nell'urina dei pazienti (Anstey NM *et al.*; Ochoa JB, 1991). L'NO prodotto ha una potente azione battericida, infatti l'inibizione della sua produzione determina l'aggravamento dell'infezione microbica (Stenger S *et al.*, 1996; MacMicking J.D. *et al.*, 1997).

Gli effetti dei biomateriali sul rilascio di ossido nitrico non sono stati ancora chiariti. L'NO viene prodotto a partire dall'amminoacido L-arginina in una reazione *multi-step* catalizzata dall'ossido nitrico sintasi (NOS); esistono tre isoforme di questo enzima, una inducibile (iNOS) e due costitutive (cNOS), ossia quella endoteliale (eNOS) e quella neuronale (nNOS). Quest'ultime, sempre presenti nelle cellule, sono regolate dall'aumento di Ca^{2+} intracellulare e dal legame con la calmodulina (MacMicking J.*et al.*, 1997). iNOS, d'altra parte, viene espressa soltanto in presenza di citochine pro-infiammatorie e/o tossine batteriche e produce grandi quantità di NO per lunghi periodi di tempo (Stuehr D., 1999; Ou J *et al.*, 1997); inoltre, si è visto che questo enzima è coinvolto anche nella produzione di O_2^- (Xia Y., 1997). Le interazioni dell'ossido nitrico con l'anione superossido determinano la formazione di perossinitrito ($OONO^-$), un potente agente citotossico che agisce su diversi *targets* biologici, inattivando canali ionici, danneggiando il DNA, addizionando molecole di azoto su residui tirosinici in enzimi bersaglio ed interferire con la trasduzione del segnale (Ye Y.Z. *et al.*, 1996).

L'importanza dell'ossido nitrico risiede, non solo nei suoi effetti citotossici, ma anche nell'azione vasodilatatoria che esercita sulle cellule muscolari lisce dei vasi; una volta rilasciato nell'endotelio, l'NO diffonde nel sangue e inibisce l'adesione e l'aggregazione delle piastrine, promuovendo la fluidità del sangue e prevenendo la trombosi (Moncada & Higgs, 2006).

1.5 Valutazione della biocompatibilità

La caratterizzazione dei biomateriali e dei dispositivi destinati ad un contatto sul medio e sul lungo termine con l'organismo (fluidi biologici, tessuti e organi) non può essere completa senza una valutazione circa la loro "biocompatibilità". Questa

valutazione va condotta allo scopo di esaminare le prestazioni del biomateriale in condizioni simili a quelle dell'ambiente biologico.

La biocompatibilità di un materiale, infatti, non consiste unicamente nell'assenza di effetti tossici sui tessuti con cui viene a contatto, ma piuttosto, come abbiamo evidenziato in precedenza, nella sua abilità a svolgere la funzione per la quale è stato progettato, innescando una risposta appropriata nell'ospite (Williams D.F., 1987).

Un dispositivo deve essere realizzato in funzione della problematica medica che si vuole risolvere: un materiale utilizzato in modo soddisfacente per una data applicazione e quindi considerato biocompatibile in un certo ambito, può, se usato in modo differente o impiantato in un sito diverso da quello solito, indurre una differente risposta dell'organismo, cioè può, in definitiva, dar luogo ad un risultato insoddisfacente.

La biocompatibilità di un impianto, dunque, viene valutata sulla base di diversi parametri relativi sia alle caratteristiche chimico-fisiche del materiale, che alle caratteristiche dell'ospite (Fournier E. *et al.*, 2003).

I principali fattori dipendenti dall'organismo ospite sono la specie, il corredo genetico, il sito dell'impianto e il suo microambiente, mentre quelli che dipendono dal materiale sono la forma, le dimensioni, la chimica di superficie, la ruvidità, il *design*, la morfologia e la porosità, la composizione, le tecniche di sterilizzazione, le procedure di applicazione, la durata del contatto e la facilità o meno a degradarsi (Laurencin C.T. *et al.*, 1994; Gentile F.T. *et al.*, 1995; Babensee J.E. *et al.*, 1998).

La ruvidità riveste un ruolo importante nel determinare l' "emocompatibilità" di un materiale dal momento che il sangue coagula più facilmente e più velocemente su superfici ruvide piuttosto che su quelle lisce. Ad esempio, la superficie di alcune protesi valvolari meccaniche viene finemente lucidata, sia per limitare la coagulazione, sia per facilitare il distacco di formazioni trombotiche microscopiche, prima che raggiungano dimensioni pericolose. Un'accurata sterilizzazione del dispositivo impiantabile è fondamentale al fine di evitarne la colonizzazione batterica; anche il fattore tempo è rilevante nella determinazione della biocompatibilità: una membrana per emodialisi è utilizzabile soddisfacentemente perché rimane a contatto con il sangue per poche ore, un contatto prolungato comporterebbe danni per il paziente; analoghe considerazioni possono essere fatte per un catetere che può rimanere inserito al più per una settimana, o per una protesi

ortopedica, che può invece rimanere impiantata per tutta la durata della vita del paziente.

La degradazione di un materiale da parte dell'organismo può essere considerata un "cattivo" effetto, in termini assoluti, a causa del rilascio di molecole potenzialmente tossiche, ma la biodegradazione di una sutura interna ha sicuramente aspetti positivi nel determinare la guarigione di una ferita.

La biocompatibilità è strettamente connessa ai fenomeni di superficie, rappresentati dalle interazioni cellula-cellula, cellula-polimero, polimero-proteina (Laurencin C. T. *et al.*, 1994). Da questo punto di vista, un vantaggio notevole è offerto dai "polimeri sintetici" poiché possono essere facilmente modificati, soprattutto nella chimica di superficie, in modo da ottenere variazioni nell'intensità e nella durata della reazione tissutale che innescano.

Sfortunatamente la biocompatibilità non è una grandezza misurabile e di conseguenza non esistono metodi per effettuare delle misure precise. Il giudizio finale per stabilire la biocompatibilità rimane solamente la verifica di una soddisfacente prestazione clinica.

In ogni caso, prima che un dispositivo medico possa essere commercializzato e dunque utilizzato in ambito clinico, è necessario che la sua biocompatibilità venga acquisita con certezza (testata e documentata) e poi approvata dagli organismi deputati (FDA, marchio CE, ecc.).

Questo è quanto prescritto dalle leggi nazionali ed internazionali che, in generale, richiedono la prova della sicurezza ed efficacia nell'utilizzo dei dispositivi medici sotto le circostanze previste.

La valutazione della biocompatibilità viene di norma condotta all'interno di centri di ricerca accreditati, seguendo ben precise procedure standard, facendo ricorso a strumentazione particolare e a personale adeguatamente addestrato: di fatto, queste condizioni fanno sì che le valutazioni di biocompatibilità esulino dalle possibilità economiche e dalle priorità scientifiche dei gruppi di ricerca e delle imprese di medio-piccole dimensioni.

Il primo passo nella valutazione della biocompatibilità consiste nella caratterizzazione *in vitro* delle proprietà chimico-fisiche delle materie prime con cui verranno costruiti i "prototipi" dei dispositivi biomedici; questi dati vanno comparati con i risultati che si hanno al termine di ogni fase del processo produttivo (manifattura, sterilizzazione, confezionamento, stoccaggio).

La verifica della biocompatibilità, intesa come analisi delle interazioni materiale-organismo, viene eseguita sui soli dispositivi che abbiano superato queste prove preliminari e consiste nell'applicazione di test *in vitro* (con cellule e tessuti), test *in vivo* (su modelli animali) e *trials* clinici.

A questo scopo, le organizzazioni nazionali ed internazionali che si occupano di standardizzazione come ASTM (*American Society for Testing and Materials*), ISO (*International Standards Organization*), FDA (*Food and Drug Administration*), NIH (*National Institutes of Health*) hanno già sviluppato ed adottato specifiche linee guida e specifiche procedure (Ratner B.D., 2004).

Test *in vitro*

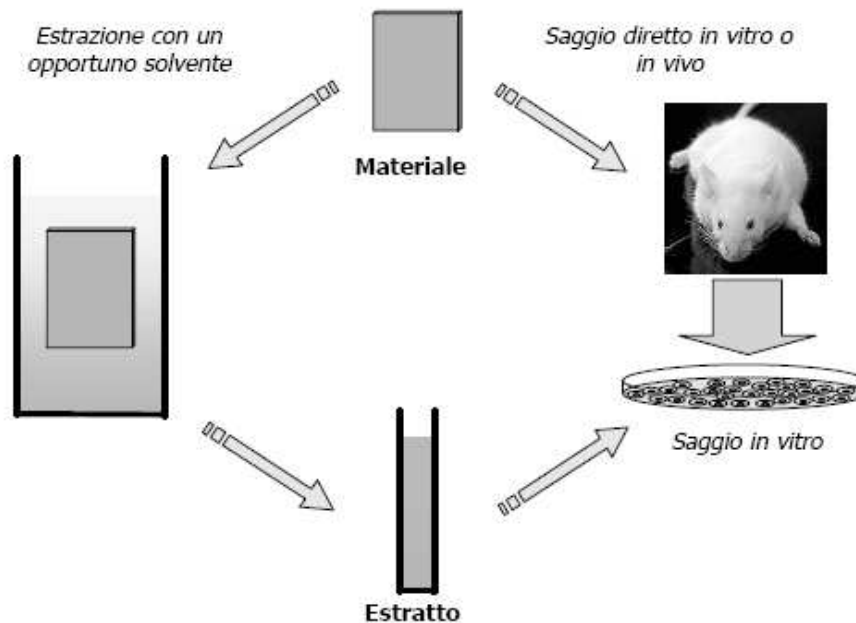
I principali vantaggi dei test *in vitro* sono legati ai costi contenuti, alle piccole dimensioni delle apparecchiature richieste e alla relativa velocità di esecuzione che permette di valutare rapidamente, e confrontare, molti materiali e molti dispositivi. Solitamente si utilizzano come modelli sperimentali le “linee cellulari stabilizzate” disponibili presso banche cellulari nazionali ed internazionali (come, ad esempio, *l’American Type Culture Collection, ATCC*); esse, a differenza delle colture primarie (cellule appena isolate dagli organi), garantiscono una maggiore riproducibilità, efficienza e disponibilità (Northup S.J. 2004).

I test *in vitro* comprendono principalmente saggi di citotossicità, citocompatibilità, mutagenicità, emocompatibilità.

I test di citotossicità, in accordo con lo “standard ISO 10993-5”, rappresentano un “metodo di valutazione dei danni biologici acuti provocati dalle sostanze rilasciate dai dispositivi medici tramite l’osservazione degli effetti che queste producono su cellule coltivate in vitro in un mezzo nutriente”.

Tali test possono basarsi sull’utilizzo diretto del materiale oppure sull’utilizzo di un estratto ricavato con il metodo dell’eluizione (fig. 1.31) (Northup S.J., 2004).

Nel primo caso, il campione da esaminare e quello di riferimento vengono posti direttamente nel mezzo di coltura; nel secondo caso, gli estratti ottenuti vengono utilizzati come nuovo nutriente delle colture cellulari.



. Fig 1. 31: schema dei test di citotossicità.

I monostrati cellulari, se si tratta di cellule in adesione come i fibroblasti di topo L929, vengono quindi osservati al microscopio per scoprire l'insorgere nel tempo di eventuali segnali di un'azione tossica (cambiamenti nelle dimensioni o nell'aspetto dei componenti cellulari, lisi cellulare, ecc.).

La vitalità cellulare, oltre ad essere valutata mediante osservazioni morfologiche, può essere esaminata con l'analisi della funzionalità della cellula; in questo caso si eseguono test colorimetrici che permettono di effettuare dosaggi degli enzimi o delle proteine totali.

I test più comunemente utilizzati sono:

- Test del Neutral Red (*Neutral Red Uptake Assay*): si basa sulla capacità dei lisosomi perfettamente funzionanti nelle cellule vive di incorporare il colorante *Neutral Red* assumendo una tipica colorazione rossa, la cui intensità può essere misurata spettrofotometricamente. Viceversa se i lisosomi cellulari

sono danneggiati rilasceranno nel citoplasma enzimi idrolitici che provocheranno la distruzione della stessa cellula (fig. 1.32).

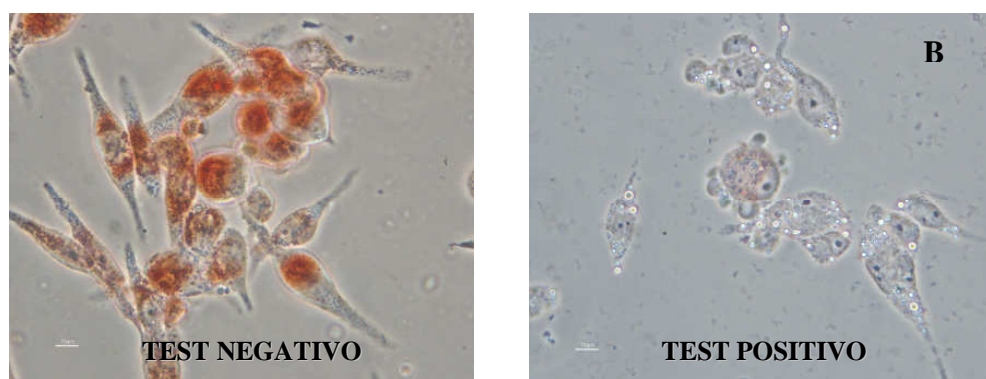


Fig. 1.32: cellule THP-1 vitali che hanno incorporato il Neutral Red (A). Cellule THP-1 dopo trattamento con agente citotossico (B). Ingrandimento 40X.

- Test MTT: si basa sulla capacità dell'enzima mitocondriale succinato deidrogenasi, presente nelle cellule metabolicamente attive, di trasformare il sale MTT (3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-Difeniltetrazolio Bromide) in sale di formazano di colore blu-viola. L'intensità del colore, proporzionale al numero di cellule vitali, viene determinata spettrofotometricamente (fig. 1.32).

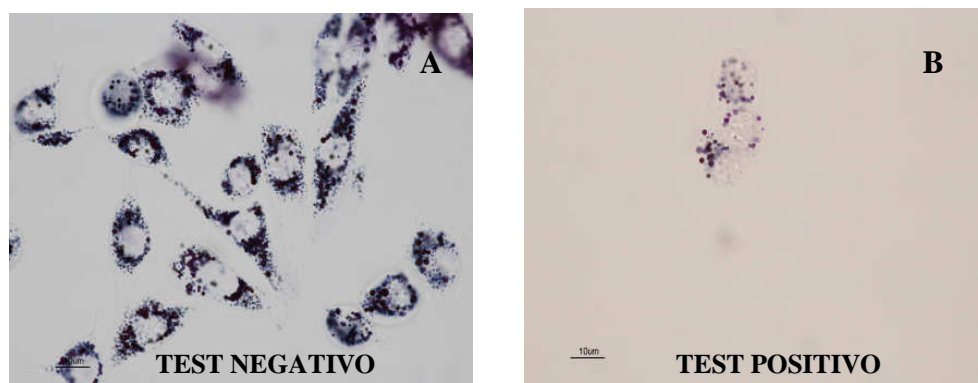


Fig 1.33 cellule HeLa vitali contenenti il sale di formazano (A) e dopo trattamento con agente citotossico (B). Ingrandimenti 40X.

- Test del Kenacid Blue (KB): permette di valutare il numero di cellule vive attraverso un dosaggio delle proteine totali. Il test si basa sull'uso di un

colorante che, aggiunto alle cellule dopo che queste siano state fissate, si lega specificamente alle proteine. Dopo l'aggiunta di una specifica sostanza decolorante, il KB viene rilasciato e quantificato attraverso la misura spettrofotometrica dell'assorbanza.

Tra i saggi di mutagenicità *in vitro* quello più utilizzato è il “test di Ames”(fig 1.34), messo a punto nel 1975 dal professor Ames dell'Università di Berkeley, California, e successivamente modificato (Maron e Ames, 1983).

In questo caso, il modello sperimentale non è rappresentato da linee cellulari, bensì da ceppi di *Salmonella typhimurium* resi auxotrofi per l'istidina (cioè istidina-dipendenti), che, quindi, non sono in grado di crescere in un terreno privo di questo aminoacido, essendo divenuti geneticamente incapaci di sintetizzarlo. Pertanto, possono fungere da indicatori dell'attività mutagena di agenti genotossici poiché, in loro presenza, i geni alterati deputati alla sintesi dell'istidina riprendono la loro primitiva funzionalità (*retromutazione*), consentendo ai batteri di crescere formando colonie visibili. Il numero delle colonie batteriche cresciute in assenza di istidina (*revertenti*) fornisce una misura dell'attività mutagena del composto (per es. un biomateriale) o della miscela in esame.

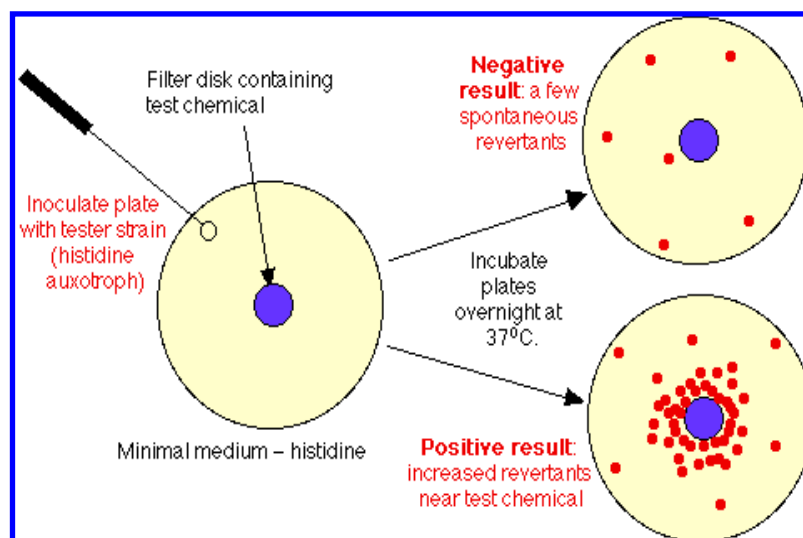


Fig. 1.34: test di Ames

Infine, tra i test *in vitro* vanno ricordati quelli di emocompatibilità che possono essere eseguiti in condizioni statiche o dinamiche (in flusso), a seconda della destinazione d'uso del materiale/dispositivo biomedico. Tali test valutano le

alterazioni morfologiche e funzionali a carico delle cellule del sangue e di quelle endoteliali.

Le analisi morfologiche (osservazioni al microscopio ottico o a quello elettrico a scansione) implicano lo studio di eventuali alterazioni strutturali, quali degenerazione, lisi o morte che possono verificarsi in seguito ad applicazione dell'impianto. Le analisi funzionali riguardano la valutazione di alcune caratteristiche delle cellule endoteliali come la capacità di adesione, il loro indice mitotico, la loro attività secretiva in presenza dell'impianto. L'emocompatibilità di materiali e dispositivi viene determinata, inoltre, verificando la formazione di coaguli sulla superficie, l'adesione delle piastrine, l'attivazione del complemento e dei leucociti.

I test *in vitro* sono attualmente considerati efficaci per una valutazione preliminare della biocompatibilità dei materiali. Come per qualsiasi altro modello, anche in questo caso va prestata parecchia attenzione nell'interpretare i risultati, evitando rischiose estrapolazioni. Tali test ci consentono di studiare le funzioni e i meccanismi di singole linee cellulari e questo comporta evidenti limiti in considerazione della notevole complessità dell'ambiente biologico reale (Ratner B.D., 2004). Per queste ragioni, i dati dei test *in vitro* vanno integrati con i risultati che si devono ottenere attraverso studi su modelli animali per fornire una spiegazione più adeguata dei meccanismi che dirigono, mediano e controllano le interazioni tra materiali e tessuti, in un ambiente che è di per sé estremamente complesso, interattivo e dinamico.

Test in vivo

Sono sicuramente i test più validi per verificare la biocompatibilità dei materiali e dei dispositivi, ma la loro applicazione spesso risulta difficile a causa di problemi etici, alti costi, tempi lunghi.

Inoltre, risultati positivi non necessariamente provano la compatibilità sull'uomo: come è noto, differenze nelle specie animali compromettono l'estrapolazione degli esiti delle prove *in vivo* fra modelli diversi. In virtù della loro omologia con l'uomo, sono i primati non umani i modelli animali più attendibili.

L'utilizzo di animali in laboratorio per la ricerca e per le prove di biocompatibilità implica una grande responsabilità e dovrebbe essere preso in considerazione solo dopo una completa caratterizzazione preliminare dei materiali/dispositivi, dopo

adeguate simulazioni al computer ed esauriente verifica *in vitro*. I ricercatori dovrebbero identificare, di volta in volta, la specie animale più adatta al tipo di studio, selezionando il minimo numero di individui che possa condurre a risultati statisticamente significativi.

I test su animali utilizzati per la valutazione della biocompatibilità dei materiali possono essere suddivisi in tre principali categorie (<http://www.dpci.unipd.it>).

- Test non funzionali
- Test *ex-vivo*
- Test funzionali

Nel caso di test non funzionali, campioni di forma arbitraria sono impiantati nei tessuti molli (per esempio, per sotto cute, nel muscolo, nella cavità peritoneale) mediante interventi chirurgici poco invasivi. Hanno breve durata (giorni-mesi), ma forniscono significative informazioni circa le interazioni locali tra materiale e tessuto e le eventuali complicanze sistemiche.

I dati sono raccolti in assenza di carichi meccanici e mancano di ogni valutazione circa la funzionalità della protesi.

I test *ex-vivo* si basano sull'utilizzo di derivazioni arteria-vena e vena-vena che permettono al sangue dell'animale di fluire attraverso i materiali da testare in un circuito

esterno. In questo caso si valutano l'accumulo di proteine, l'adesione delle piastrine, la formazione di coaguli, allo scopo di verificare la compatibilità del materiale con il sangue.

L'esecuzione di test funzionali prevede l'inserimento nell'animale del dispositivo che si vuole testare in scala appropriata (ad esempio, una protesi d'anca o una valvola cardiaca opportunamente dimensionate), per svolgere la funzione prevista nell'animale, in condizioni analoghe a quelle previste per l'impiego nell'uomo. Si tratta di studi a lungo termine che richiedono speciali progettazioni e risultano pertanto assai costosi e complessi.

DEVICE CATEGORIES			BIOLOGICAL EFFECT												
BODY CONTACT	CONTACT DURATION		Cytotoxicity	Sensitization	Irritation/Intracutaneous	Acute Systemic Toxicity	Subchronic Toxicity	Genotoxicity	Implantation	Hemocompatibility	Chronic Toxicity	Carcinogenicity	Reproductive/Developmental	Biodegradation	
	A - Limited (<24 Hours)	B - Prolonged (24 Hours - 30 Days)													C - Permanent (>30 Days)
SURFACE DEVICES	Skin	A	x	x	x										
		B	x	x	x										
		C	x	x	x										
	Mucosal Membrane	A	x	x	x										
		B	x	x	x	o	o		o						
		C	x	x	x	o	x	x	o		o				
	Breached or Compromised Surfaces	A	x	x	x	o									
		B	x	x	x	o	o		o						
		C	x	x	x	o	x	x	o		o				

X = Tests per ISO 10993-1

O = Additional tests that may be applicable in the U.S.

Note¹ - Tissue includes tissue fluid and subcutaneous spaces

Note² - For all devices used in extracorporeal circuits

Fig 1.35: tabella relativa alle linee guida FDA/ISO per l'esecuzione di test *in vivo* su modelli animali (da <http://www.dpci.unipd.it>).

Anche per l'esecuzione dei test *in vivo*, come per quelli *in vitro*, metodologie e procedure dettagliate sono disponibili nelle pubblicazioni di ASTM e NIH; inoltre, un utile riferimento è rappresentato dalle tabelle basate sulle linee guida FDA/ISO: esse (fig. 1.35) permettono di identificare le tipologie di test da adottare in funzione dell'uso previsto (esterno, comunicante con l'esterno, interno), del tipo di tessuto a contatto con il materiale, della durata del contatto (temporaneo, breve termine, lungo termine). Evidentemente, quanto più prolungato è il contatto con l'organismo, tanto maggiore è il numero dei test prescritti.

I test *in vivo* più comunemente utilizzati sono:

- Test di sensibilizzazione (standard ISO 10993-10): viene effettuato sulla pelle di cavie (soprattutto porcellino d'India) ed è finalizzato all'osservazione dell'insorgere di reazioni di sensibilizzazione in conseguenza dell'azione ripetuta e prolungata di sostanze rilasciate dal materiale, capaci di interagire con il sistema immunitario. La reazione di sensibilizzazione si manifesta come arrossamento e rigonfiamento dei tessuti (fig. 1.36). Vi sono due modi alternativi di condurre il test di sensibilizzazione: Test di Buehler e Test massimizzazione o di Magnuson-Kligman. Il primo prevede una fase di "induzione" in cui il materiale da saggiare viene posto direttamente a contatto con la pelle rasata del dorso di porcellini d'India (operazione ripetuta almeno tre volte a settimana per tre settimane). Segue un periodo di riposo di due settimane per permettere il manifestarsi di una risposta nella cavia; quindi avviene l'esposizione finale al biomateriale.



Fig. 1.36: risposta positiva al test di Magnuson-Kligman eseguito su pelle di porcellino d'India (da www.dpci.unipd.it).

Il secondo prevede l'applicazione ripetuta a gruppi separati di porcellini d'India di estratti del materiale con soluzioni saline o con olii. Questo metodo è più sensibile del precedente e trova applicazione al caso di dispositivi che entreranno in contatto con aree diverse dalla pelle.

- Test di irritazione (standard ISO 10993-10): valuta la risposta infiammatoria locale ad applicazioni singole, ripetute e continue della sostanza in prova, senza che sia coinvolto un meccanismo immunitario. Per questo tipo di test vengono utilizzati estratti fluidi salini o in olio vegetale o direttamente il materiale in esame. L'applicazione del campione avviene generalmente a livello intracutaneo o della pelle primaria o oculare. Sintomi tipici dell'irritazione sono arrossamento, gonfiore (fig. 1.37), riscaldamento e dolore.
- Test di impianto (standard ISO 10993-6): fornisce indicazioni sulla specie animale da impiegare come cavia, sul tipo di tessuto più adatto all'impianto, su quanto tempo il materiale deve rimanere impiantato, sul metodo d'impianto, sulla valutazione della risposta biologica. L'applicazione generale di questi test prevede il taglio del materiale in un campione della forma desiderata, la sterilizzazione di tale campione, il suo impianto in condizioni asettiche, l'esame finale dei tessuti circostanti il luogo dell'impianto, dopo un periodo variabile tra una settimana e alcuni mesi.



Fig. 1.37: test di irritazione intracutaneo su un coniglio albino (da www.dpci.unipd.it).

La risposta biologica all'impianto viene valutata osservando al microscopio sezioni di tessuto opportunamente colorate con le tecniche di immunistochemica; ciò consente di determinare il tipo di cellule presenti, l'eventuale presenza di necrosi, la presenza di

collagene e molti altri parametri. Per gli impianti a breve termine si utilizzano, generalmente, come cavie, topi, ratti, porcellini d'India o conigli; per i test a lungo termine (impianti in tessuto sottocutaneo, muscolo, osso) si utilizzano anche cani, pecore, capre ed altri animali che abbiano una lunga aspettativa di vita (Anderson J.M. and Schoen F.J., 2004).

Come previsto dagli standard ISO 10993 (tabella in fig. 1.35) esistono altri test *in vivo* per valutare la biocompatibilità dei materiali utilizzati nei dispositivi biomedicali. Tra questi ricordiamo i test di tossicità sistemica acuta, subacuta e subcronica che forniscono indicazioni sugli effetti potenzialmente nocivi provocati dai materiali o dispositivi o estratti su tessuti e organi *target* lontani dal sito di impianto; un esempio è rappresentato dal “test di pirogenicità” eseguito sul coniglio, che valuta la comparsa di febbre come manifestazione di una reazione infiammatoria sistemica successiva all'impianto. Infine, tra i test *in vivo*, ricordiamo quelli di genotossicità (“test dei micronuclei”), carcinogenicità, tossicità sulla funzione riproduttiva e sullo sviluppo embrionale (teratogenicità), biodegradazione (Anderson J.M. and Schoen F.J., 2004).

Trials clinici

A prescindere dal successo dei precedenti test *in vitro* e su modello animale, non è possibile prevedere le prestazioni di materiali e dispositivi sull'uomo senza *trials* clinici. La sperimentazione clinica è necessaria prima di rendere disponibile al pubblico il materiale/dispositivo.

Per poter richiedere alle agenzie nazionali ed internazionali (per esempio, FDA o Ministero della Salute) l'autorizzazione alla sperimentazione clinica, è necessario documentare con precisione e chiarezza gli esiti positivi della precedenti test (*in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*). Va poi data prova dei benefici per i riceventi e dell'assenza di rischi. Inoltre, devono essere descritti nel dettaglio il materiale/dispositivo, la procedura chirurgica, il trattamento post-operatorio e il tipo di valutazione attesa. La valutazione può riguardare il confronto tra le condizioni del paziente prima e dopo l'applicazione del dispositivo biomedico, oppure il confronto con altri soggetti sani di un gruppo di controllo scelto adeguatamente per sesso, età, salute. I protocolli

sperimentali sono sottoposti al giudizio degli organismi deputati, la cui approvazione assicura il rispetto non solo delle leggi vigenti, ma anche dei diritti e della dignità dei pazienti che si sottopongono alla sperimentazione fornendo il loro consenso informato.

Una volta approvata, la sperimentazione prevede di inserire il materiale/dispositivo in un certo numero di soggetti come parte di uno studio, limitato ma ben controllato e monitorato, finalizzato allo svolgimento di una sequenza di tre fasi (I, II e III). Gli esiti della sperimentazione con l'indicazione dei risultati (sia positivi che negativi), dei dati del decorso clinico (*follow-up*), dei dati quantitativi e dei pareri circa il significato delle conclusioni, devono essere presentati all'organismo notificato che avrà la responsabilità della approvazione finale prima della commercializzazione. Ovviamente le aziende che vogliono condurre questi studi così complessi devono programmare ingenti investimenti prima di arrivare al termine del processo di sviluppo di prodotti biomedici commerciali, il che richiede generalmente 15-16 anni (fig. 1.38).

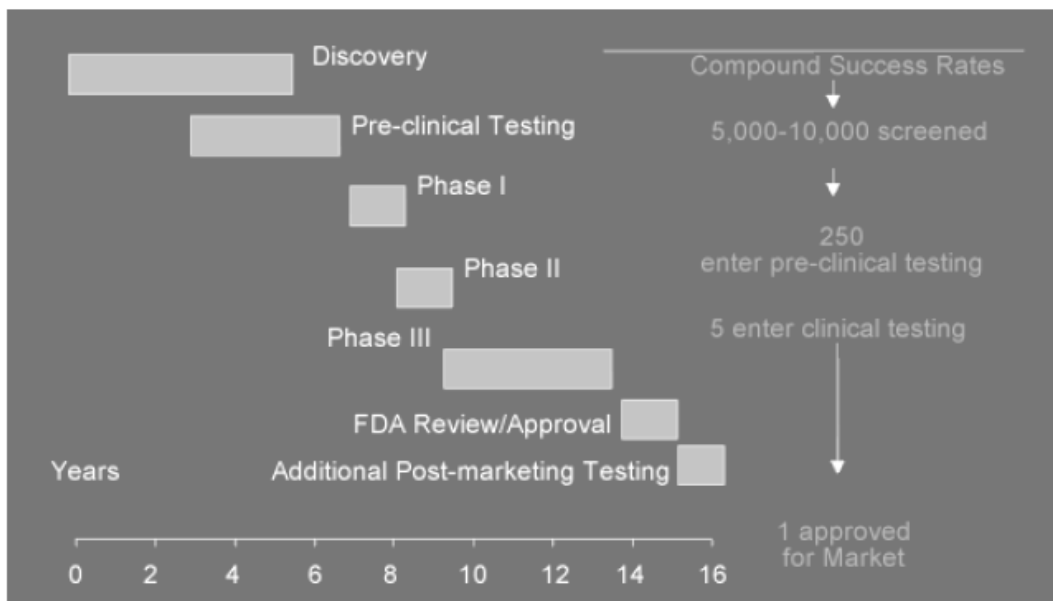


Fig. 1.38: fasi dello sviluppo di un presidio biomedico dalla progettazione fino alla commercializzazione (da www.dpci.unipd.it).

Infine, informazioni importanti possono essere ricavate dal recupero degli impianti, delle protesi e dei tessuti circostanti da pazienti che sono al termine della loro vita o che hanno subito il fallimento dell'impianto. L'esame dei materiali espantati fornisce utili evidenze circa la loro sicurezza ed efficacia, permette di determinare le

cause dell'eventuale fallimento e di aumentare le conoscenze circa le interazioni materiali-tessuti biologici. Queste informazioni potrebbero essere cruciali per migliorare la progettazione e la fabbricazione, per stabilire criteri di selezione, per sviluppare protocolli e tecniche per le diverse fasi della valutazione degli impianti.

2. SCOPO DELLA TESI

La ricerca di nuovi materiali biocompatibili e facilmente impiantabili propone continuamente nuove molecole e nuove sostanze con caratteristiche biologiche, chimiche e fisiche sempre più adattabili alla chirurgia estetica e ricostruttiva ma non solo. I biomateriali polimerici, infatti, sono largamente utilizzati anche per la realizzazione di dispositivi medici che possano ripristinare funzioni biologiche compromesse in virtù della loro facile processabilità in forme o strutture complesse e della possibilità di modificarne fisicamente o chimicamente la superficie.

Due classi di biomateriali polimerici sembrano rispondere meglio a questi requisiti, quella rappresentata dagli “*hydrogels*” e quella rappresentata dagli “*elastomeri*”. Proprio a queste due classi appartengono i polimeri oggetto di studio di questa tesi sperimentale, ossia polialchilimide (PAI) e polivinilalcol (PVA) che rientrano nella prima, e poliuretano che fa parte della seconda.

PAI e PVA, definiti “*synthetic injectable fillers*”, trovano comunemente impiego nella riparazione di difetti estetici seri o comuni, congeniti o causati da traumi, grazie alla loro bassa invasività, al loro elevato contenuto in acqua, permeabilità all’ossigeno, elasticità. Il poliuretano, invece, grazie alle sue ottime proprietà meccaniche e alla sua buona emocompatibilità, trova utilizzo soprattutto nella realizzazione di protesi cardiovascolari.

L’esito dell’utilizzo di questi biomateriali nell’applicazione clinica, sia nel caso in cui vengano a contatto con i tessuti molli (*hydrogels*) che con il sangue (poliuretano), dipende soprattutto dalla loro biocompatibilità. Un materiale scarsamente biocompatibile, infatti, può indurre una risposta del sistema immunitario talmente aggressiva da compromettere il buon esito della sua applicazione.

Dal momento che la risposta infiammatoria innescata dall’impianto di un biomateriale nel tessuto ospite è caratterizzata principalmente dal richiamo di monociti e dalla loro successiva attivazione in macrofagi, i nostri studi sono stati eseguiti in parallelo su tre linee cellulari che rappresentano tre diversi stadi del differenziamento macrofagico: i pro-monociti U937, i monociti THP-1 e i macrofagi RAW 264.7.

L'analisi preliminare della citotossicità esercitata dai nostri polimeri sulle tre linee cellulari è stata condotta con l'ausilio di due test colorimetrici, MTT e Neutral Red, che valutano rispettivamente l'attività mitocondriale e lisosomale delle cellule metabolicamente attive e perciò vitali; inoltre, le osservazioni al microscopio ottico in campo chiaro hanno permesso di individuare eventuali alterazioni della morfologia cellulare o episodi di necrosi o di apoptosi (colorazione con ematossilina/eosina).

Dopo aver accertato l'assenza di citotossicità, lo studio è proseguito con la valutazione dell'induzione al differenziamento esercitata dai tre biomateriali sulle tre linee. Il differenziamento dei monociti in macrofagi, indice di attivazione di queste cellule, è stato analizzato attraverso la valutazione di numerosi parametri, ossia l'adesione al biomateriale, la distribuzione degli antigeni di superficie, la fagocitosi, il rilascio di citochine pro-infiammatorie e di ossido nitrico.

Il fine ultimo di questo lavoro sperimentale sarà quello di correlare la risposta biologica indotta dai biomateriali presi in esame con quelle che sono le loro caratteristiche strutturali. Soltanto una conoscenza approfondita di tali correlazioni permetterà di progettare polimeri sintetici che si integrino sempre più facilmente nel corpo umano.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Biopolimeri

Hydrogels

Gli *hydrogels* presi in esame vengono forniti dalla Polymekon srl (Milano), la cui area di Ricerca e Sviluppo è situata nella “Cittadella della Ricerca” di Brindisi.

BIO-ALCAMID[®] (Polialchilimide, PAI) è un hydrogel poliacrilico contenente gruppi immido-ammidici crosslinkati con metodo redox e acqua apirogena sterile (96%) (Dini *et al.*, 2005). I gruppi immidici (fig. 3.1), caratterizzati da un ammido secondaria legata a due gruppi carbonilici (R-CO-NH-CO-R), creano un network tra le catene e sono responsabili, insieme ai gruppi ammidici, della stabilità del polimero.

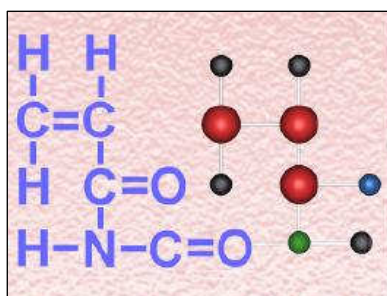


Fig 3.1 gruppo immido-ammidico

La differenza con gli altri derivati acrilici non consiste solo in una reticolazione più articolata, ma anche nella presenza di particolari gruppi funzionali periferici che contribuiscono alla maggiore stabilità molecolare. BIO-ALCAMID[®] è presente in diverse formulazioni che differiscono per la consistenza del polimero; quella utilizzata nei nostri esperimenti è la *Body-form*, contenuta in una siringa sterile da 5 ml.

Bioinblue[™] (Polivinilalcol, PVA) è un prodotto testato e certificato (CE). È costituito da alcol polivinilico (8%) altamente purificato e acqua apirogena (92%). La stabilità della sua struttura è data dalla formazione di legami idrogeno intra- ed inter-molecolari tra gruppi ossidrilici (fig. 3.2); tali legami si ottengono con metodo fisico, attraverso cicli di congelamento-scongelo (Dini *et al.*, 2005).

Bioinblue[™] è contenuto in siringhe sterili da 0,7 ml.

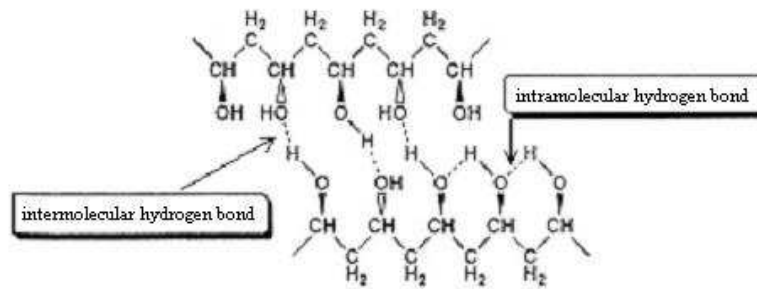


Fig 3.2 legami idrogeno presenti nel Polivinilalcol.

I due hydrogels differiscono tra loro, poiché il PAI è un filler permanente indicato per correzioni definitive (ipovolumetrie in soggetti HIV⁺, Pectus Excavatum), mentre il PVA è un filler riassorbibile utilizzato in medicina estetica per correzioni a breve termine (aumento labbra, riempimento rughe).

Poliuretano

Per i nostri esperimenti è stato utilizzato poliuretano *poly-ether based* (PEU), caratterizzato da una scarsa biodegradabilità, a differenza del *poly-ester based* che è completamente biodegradabile (Visai L. *et al.*, 2002). I nostri campioni sono stati gentilmente forniti dalla Prof. ssa Helena Janik, Gdansk University of Technology, Chemical Faculty, Polymer Technology Department, Gdansk, Poland.

Prima di ogni esperimento i campioni di PU sono stati sterilizzati per almeno 30 min. con raggi UV.

3.2 Linee cellulari

Il nostro modello sperimentale è costituito da tre linee cellulari che rappresentano tre differenti stadi del differenziamento monocitico/macrofagico: promonociti U937, monociti THP-1 e macrofagi RAW 264.7.

Le U937 sono state isolate dall'essudato pleurico di un paziente affetto da linfoma istiocitico (Sundstrom C., Nilsson K., 1976). Hanno forma rotondeggiante con dei

corti microvilli sulla superficie, inoltre presentano uno scarso citoplasma ed un particolare nucleo a forma di fascio.

Le THP-1 derivano dal sangue periferico di un paziente affetto da leucemia monocitica acuta. Hanno una forma rotondeggiante e larga; rispetto alle altre linee monocitiche, queste, una volta differenziate (ad es. in presenza di esteri del forbolo), assumono un comportamento molto simile a quello dei macrofagi nativi. Per questi motivi sono un ottimo modello di studio per capire gli eventi associati al differenziamento macrofagico e per esplorare i geni che regolano tale processo (Auwerx J., 1991).

I macrofagi murini RAW 264.7 sono stati isolati da un tumore indotto iniettando intraperitonealmente il virus della leucemia di Abelson in un topo maschio (Raschke W.C. *et al.*, 1978).

Le linee utilizzate nei nostri esperimenti sono state acquistate dall'Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro di Genova..

Le linee U937 e THP-1 crescono in sospensione in terreno RPMI 1640 (Cambrex, Verviers, Belgium), mentre le RAW 264.7 crescono in adesione in terreno DMEM (Cambrex, Verviers, Belgium). Entrambi i terreni vengono addizionati con:

- Siero bovino fetale al 10% (Cambrex, Verviers, Belgium);
- Penicillina/Streptomicina 100 IU/ml (Sigma, St. Louis, MO);
- L-glutamina 2 mM (Cambrex, Verviers, Belgium);
- Nistatina 10000 IU/ml (Cambrex, Verviers, Belgium).

3.2.1 Mantenimento della coltura

Il terreno di coltura viene cambiato ogni tre giorni e le cellule, giunte a confluenza, divise in due fiasche sterili da 75 cm² in un volume finale di 25 ml. La procedura prevede, se si tratta delle cellule U937 e THP-1, che si aspiri la sospensione cellulare la quale viene centrifugata a 800 rpm per 7-8 min e il pellet ottenuto risospeso in terreno RPMI 1640 completo. Se le cellule crescono adese, come nel caso delle RAW 264.7, esse vengono staccate con tripsina (1:250)/EDTA (200 mg/l) (Cambrex, Verviers, Belgium) per 5 min a 37°C; l'azione della tripsina viene poi neutralizzata

aggiungendo terreno di coltura in rapporto 1:3 e le cellule centrifugate a 800 rpm per 7-8 min; infine il pellet ottenuto viene risospeso in terreno DMEM completo.

Le colture vengono mantenute alla concentrazione di circa 5×10^5 /ml in fiasche da 75 cm^2 a 37°C in atmosfera al 5% CO_2 e 99% di umidità.

3.2.2 Tecniche di congelamento e scongelamento

Congelamento

Le cellule vengono sospese ad una concentrazione di 3×10^6 /ml in terreno al 20% di siero fetale bovino e al 10% di DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Il dimetilsolfossido è un crioconservante che determina la formazione di un ambiente ipertonico, perciò disidrata le cellule, impedendo la formazione di cristalli che potrebbero danneggiarle.

Il terreno, prima di essere utilizzato, viene portato ad una temperatura di -20°C . La sospensione cellulare viene aliquotata in *criovials* che vengono tenuti *overnight* a -20°C e successivamente portati a -80°C . I passaggi graduali a temperature discendenti si effettuano per evitare che le cellule subiscano uno shock termico.

Scongelamento

Le cellule conservate a -80°C vengono scongelate gradualmente in un bagnetto termostato fino a 37°C e centrifugate alla velocità di 800 rpm per 10 minuti, in modo da allontanare il DMSO che è tossico; quindi vengono risospese in terreno completo al 20% di siero fetale bovino ed incubate a 37°C , in presenza del 5% di CO_2 ed al 99% di umidità.

Le cellule saranno subcoltivate per almeno una settimana prima di essere utilizzate negli esperimenti. Durante la settimana di subcultura si passerà gradatamente da terreno al 20% di siero a terreno al 10%.

3.3 Schema degli esperimenti

Esperimenti con Hydrogels

Le cellule THP-1 e U937 vengono piastrate alla concentrazione di $5 \times 10^5/\text{well}$ ($2 \times 10^5/\text{well}$ negli esperimenti di immunomarcatura) in *multiwell* da 6, in un volume di 3 ml di terreno per pozzetto. I pozzetti devono essere precedentemente trattati con una soluzione di fibronectina (1 ml/*well*) (Sigma, St. Louis, MO) alla concentrazione finale di 10 µg/ml in PBS (0.2 M, PH 7.4) che viene lasciata agire per 18 h a 4°C. Successivamente si elimina la fibronectina e si dispensa in ciascun pozzetto 1 ml di una soluzione saturante costituita da albumina serica bovina (BSA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) all'1% in PBS (0.2 M, PH 7.4) che viene lasciata agire per 90 min. a temperatura ambiente. Il trattamento con fibronectina crea un ambiente simile a quello fisiologico e favorisce l'adesione dei monociti al substrato quando passano da una crescita in sospensione ad una in adesione, indice di differenziamento.

Le cellule RAW 264.7 che crescono naturalmente in adesione non richiedono il trattamento dei pozzetti con fibronectina; esse vengono piastrate ad una concentrazione di $1,5 \times 10^5/\text{well}$ in *multiwell* da 6.

Le cellule vengono incubate per diversi tempi (24, 48 e 72 h) con i rispettivi trattamenti (in doppio), secondo il seguente schema (fig 3.3) :

- CTRL: corrisponde al controllo negativo dell'esperimento, cioè alle cellule che sono state incubate senza subire alcun trattamento.
- TPA (Sigma, St. Louis, MO): corrisponde al controllo positivo, cioè alle cellule indotte a differenziare con TPA preparato in terreno di coltura alla concentrazione finale di 50 ng/ml. Il TPA (12-O-tetradecanoil-13-forbolacetato) è un estere del forbolo conosciuto come promotore tumorale che induce il differenziamento delle cellule mieloidi e sopprime la proliferazione in modo concentrazione-dipendente (Takada Y. *et al.*, 1999).
- PAI: le cellule vengono incubate con il polimero polialchilimide alla concentrazione di 50 mg/ml.

- PVA: le cellule vengono incubate con il polimero polivinilalcol alla concentrazione di 50 mg/ml.

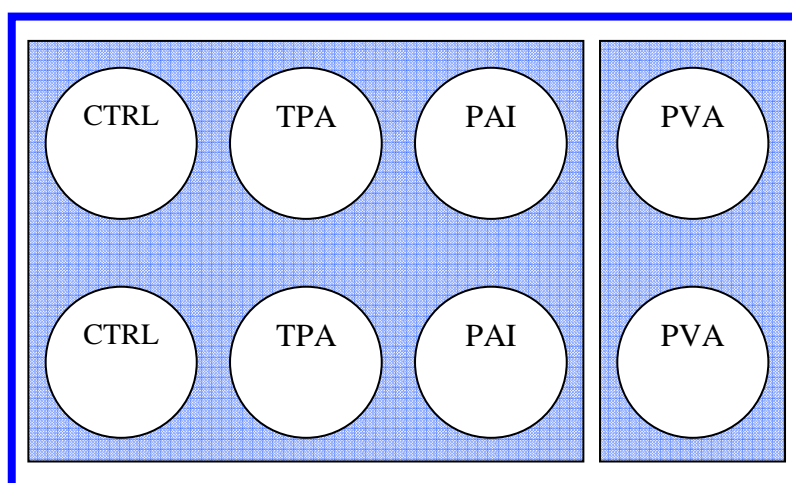


Fig 3.3 schema di piastratura relativo agli esperimenti con hydrogels.

E' necessario precisare che negli esperimenti relativi all'attivazione delle cellule RAW 264.7 (test NBT e dosaggio dell'ossido nitrico) si è utilizzato come controllo positivo il "lipopolisaccaride" batterico (LPS da *E. Coli* 0127:B8, Sigma, St. Louis, MO) alla concentrazione di 10 ng/ml. La sua funzione di attivatore macrofagico è ben documentata in letteratura (Messer R.L.W. *et al.*, 2007; Miller K.M. and Anderson J.M., 1988).

Esperimenti con Poliuretano

Per questo tipo di esperimenti si è scelto di utilizzare piastre *multiwell* da 24 pozzetti, all'interno dei quali sono state inserite sezioni circolari di poliuretano aventi un diametro di circa 1 cm; si è cioè cercato di ricoprire con il biomateriale l'intera area di base del pozzetto, in modo che le cellule vi aderissero sopra.

Le cellule U937 e THP-1 sono state incubate ad una concentrazione di 7×10^4 /well, mentre le RAW 264.7 ad una concentrazione di 5×10^4 /well.

Anche per questo tipo di esperimenti si è utilizzato un controllo negativo (CTRL) ed uno positivo rappresentato, a seconda degli esperimenti, da TPA (50 ng/ml) o LPS (10 ng/ml).

3.4 Osservazioni morfologiche

Prima di ciascun esperimento le cellule vengono osservate al microscopio ottico invertito, Nikon Eclipse TE2000-E ed eventualmente fotografate con macchina digitale Nikon Cool Pix 4500.

3.5 Colorazione con Ematossilina-Eosina

La colorazione con Ematossilina-Eosina è una tecnica di routine, applicabile ai tessuti ed alle cellule, che mette in evidenza la morfologia cellulare, colorando in modo differenziale nucleo e citoplasma. In particolare l'Ematossilina di natura basica, si lega agli acidi nucleici del nucleo colorandolo di viola, mentre l'Eosina di natura acida colora il citoplasma basofilo di rosa.

Il protocollo utilizzato è il seguente:

- Le cellule adese al vetrino vengono fissate con formalina al 4% in PBS 0,2 M, pH 7,4 per 5 min. e lavate tre volte in PBS;
- si effettuano due lavaggi in acqua distillata;
- si immerge il vetrino in ematossilina precedentemente filtrata e si lascia agire per 7-10 min.;
- si lava con acqua corrente per fissare il colorante e si effettua un ulteriore lavaggio in acqua distillata;
- si colora con eosina (preventivamente attivata mediante l'aggiunta di alcune gocce di acido acetico glaciale) per 3-4 min;
- dopo aver rimosso il colorante e lavato con acqua distillata si procede alla disidratazione mediante concentrazioni crescenti di alcoli (50%-70%-90%-100%);
- a questo punto i vetrini vengono lasciati in xilene per almeno 10 minuti ed infine montati sul portaoggetto con Eukitt® (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO);
- si lascia asciugare e successivamente si può procedere all'osservazione al microscopio ottico.

I vetrini preparati con le cellule in sospensione vengono colorati con la stessa procedura, ma prima di procedere alla colorazione viene effettuato un passaggio di idratazione con scala di alcoli decrescente (100%-90%-70%-50%).

Questa metodica è stata utilizzata anche per colorare le cellule adese alle due diverse superfici, liscia e porosa, del poliuretano; in questo modo è stato possibile effettuare una valutazione preliminare, mediante osservazione allo stereomicroscopio della citocompatibilità, intesa come capacità di indurre l'adesione cellulare, di questo biomateriale.

I coloranti sono stati preparati secondo le seguenti ricette:

Emallume Carazzi (dose per 200 ml di colorante):

- 10 g di $KAl(SO_4)_2$ in 140 ml di H_2O bidistillata
- 0,2 g Ematossilina (Sigma, St. Louis, MO)
- 0,04 g di KIO_3 in 20 ml di H_2O bidistillata
- 40 ml di glicerina

Il $KAl(SO_4)_2$ viene sciolto a caldo nell' H_2O bidistillata e poi si aggiunge l'ematossilina; contemporaneamente si scioglie a freddo il KIO_3 sempre nell' H_2O bidistillata. Quando la prima soluzione è raffreddata, si aggiunge la seconda insieme alla glicerina pura tamponata.

La soluzione di Eosina deve essere allo 0,5%, perciò si solubilizzeranno 0,5 g di eosina (Sigma, St. Louis, MO) in 100 ml di H_2O bidistillata.

3.6 Colorazione con Blu di Toluidina

- I campioni cellulari vengono fissati in formalina al 4% in PBS (0,2 M, pH 7,4) e lavati tre volte in PBS;
- si colora con una soluzione di Blu di Toluidina (Baker, Chemicals-Deventer-Holland) all'1% in H_2O bidistillata per 5 min.;
- si effettuano tre lavaggi in PBS;
- si montano i vetrini e si effettua l'osservazione al microscopio ottico.

3.7 Test colorimetrici

Test MTT

Il saggio MTT (Mosman T.J., 1983) si basa sulla capacità degli enzimi succinato deidrogenasi mitocondriali, presenti nelle cellule vitali, di trasformare il sale MTT, tetrazolium 3-(4,5-dimethylthiazolo-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, di colore giallo, in un composto, il formazano, di colore blu. La concentrazione di tale prodotto è misurata spettrofotometricamente ed è proporzionale al numero delle cellule vitali.

Il test viene eseguito secondo il seguente protocollo per cellule in sospensione:

- Dopo aver raccolto da ciascun pozzetto, corrispondente ai trattamenti effettuati, la sospensione cellulare insieme al PBS dei lavaggi (se ne eseguono tre), si centrifuga a 800 rpm per 7-8 min.;
- si risospende ciascun pellet in 1 ml di terreno di coltura contenente il sale MTT (Sigma, St. Louis, MO) alla concentrazione finale di 1 mg/ml;
- si lascia ad incubare per 2 h a 37°C in atmosfera al 5% di CO₂ e al 99% d'umidità;
- terminata l'incubazione con MTT, si raccolgono le sospensioni cellulari insieme al PBS dei 3 lavaggi e si centrifuga a 800 rpm per 7-8 min;
- i pellet cellulari così ottenuti vengono risospesi in 1 ml di DMSO per permettere la solubilizzazione dei sali di formazano;
- si centrifuga per pellettare eventuali residui cellulari, si raccoglie il sovranatante e si effettua la lettura allo spettrofotometro (DU 640B Spectrophotometer, Beckman-Coulter), ad una lunghezza d'onda di 570 nm.

Lo stesso saggio viene eseguito sulle cellule in adesione (RAW 264.7) omettendo i passaggi relativi alla raccolta delle sospensioni cellulari e alle relative centrifugate per far pellettare le cellule.

Il test deve essere eseguito al buio perché l'MTT è fotosensibile.

Test Neutral Red

Si basa sull'impiego di un colorante vitale, il Rosso Neutro (Basic Red 5, Toluylene Red), che viene catturato dai lisosomi perfettamente funzionanti delle cellule vive e poi rilasciato in una soluzione di etanolo acidificato.

L'intensità della colorazione rossa, che verrà misurata spettrofotometricamente, sarà proporzionale al numero di cellule vive.

Il saggio viene eseguito secondo il seguente protocollo:

- Le sospensioni cellulari raccolte da ciascun pozzetto insieme al PBS ricavato dai tre lavaggi vengono centrifugate a 800 rpm per 7-8 minuti;
- si risospende ciascun pellet in 1 ml di terreno di coltura contenente Neutral Red (Baker Chemicals- Deventer-Holland) allo 0,01%;
- si lascia ad incubare per 2 h a 37°C in atmosfera al 5% di CO₂ e al 99% d'umidità;
- terminata l'incubazione con Neutral Red, le sospensioni cellulari vengono raccolte insieme al PBS dei lavaggi e centrifugate;
- le cellule pellettate vengono lisate con una soluzione contenente per il 50% acqua distillata, 49% metanolo e 1% acido acetico glaciale; ciò permette il rilascio del colorante;
- si centrifuga per eliminare eventuali residui cellulari e si effettua la lettura allo spettrofotometro (DU 640B *Spectrophotometer*, Beckman-Coulter) alla lunghezza d'onda di 540 nm.

Anche in questo caso, il saggio viene eseguito sulle cellule in adesione (RAW 264.7) omettendo i passaggi relativi alla raccolta delle sospensioni cellulari e alle relative centrifugate per far pellettare le cellule.

Test NBT

Questo test misura il rilascio di anioni superossidi da parte dei macrofagi attivati (Rook G.A.W. et al., 1985), permettendo così di valutare il grado di differenziamento macrofagico. Tali ioni provocano la riduzione, ad opera delle esterasi acide, dell' NBT (nitro blu di tetrazolio) che formerà un composto insolubile, il diformazano, di colore blu. La concentrazione di tale prodotto è misurata spettrofotometricamente ed è proporzionale al numero di cellule differenziate.

Il test viene eseguito secondo il seguente protocollo:

- Le sospensioni cellulari raccolte da ciascun pozzetto insieme al PBS dei 3 lavaggi vengono centrifugate a 800 rpm per 7-8 min;
- ciascun pellet viene risospeso in 1 ml di terreno di coltura contenente NBT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) alla concentrazione finale di 335 µg/ml;
- si lascia ad incubare per 2h a 37°C in atmosfera al 5% di CO₂ e al 99% d'umidità;
- al termine dell'incubazione con NBT, si raccolgono le sospensioni cellulari, si effettuano 3 lavaggi con metanolo e si centrifuga a 800 rpm per 7-8 min;
- ciascun pellet viene risospeso in 1 ml di una soluzione di KOH (2M)/DMSO (460 µl KOH e 540 µl DMSO) per solubilizzare i sali di diformazano contenuti nelle cellule ;
- si centrifuga per eliminare residui cellulari e si leggono i sovrinatanti allo spettrofotometro (DU 640B *Spectrophotometer*, Beckman-Coulter) alla λ di 630 nm.

Lo stesso saggio viene eseguito sulle cellule in adesione (RAW 264.7) omettendo i passaggi relativi alla raccolta delle sospensioni cellulari e alle relative centrifugate per far pellettare le cellule.

Il test deve essere eseguito al buio perché l'NBT è fotosensibile.

3.8 Test di fagocitosi con particelle di *Latex*

Questo saggio permette di valutare la fagocitosi aspecifica di particelle di latex (Sigma, St. Louis, MO) aventi un diametro di 0,8 μm . Il test viene eseguito in *multiwell* da 6 pozzetti all'interno dei quali sono stati precedentemente inseriti i vetrini coprioggetto opportunamente sterilizzati; su di essi saranno rimaste adese le cellule che hanno differenziato spontaneamente (CTRL negativo) o in seguito ai trattamenti con TPA (CTRL positivo) e con gli hydrogels PAI e PVA.

Il protocollo eseguito è il seguente:

- Si rimuove da ciascun pozzetto il terreno di coltura e le cellule rimaste adese al vetrino vengono lavate una volta con PBS (0,2 M, PH 7,4) (il lavaggio deve essere molto delicato, per evitare che si stacchino);
- si aspira il PBS del lavaggio e si inserisce in ciascun pozzetto 1 ml di soluzione di latex allo 0,025% in terreno di coltura al 10% di siero;
- si lascia ad incubare per 2-4-6 h a 37°C e al 5% di CO₂;
- al termine di ciascun tempo di incubazione si aspira da ciascun pozzetto la soluzione di latex e si lava una volta con PBS;
- si effettua la fissazione delle cellule in formalina tamponata al 4% in PBS per 5 min;
- si effettua un lavaggio in PBS;
- i vetrini vengono montati con glicerina tamponata (glicerolo/PBS 1:1) e sigillati con Eukitt[®] (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)
- si effettua l'osservazione al microscopio ottico interferenziale.

3.9 Test di endocitosi in fase fluida con *Lucifer Yellow*

Il lucifer yellow VS (C₂₀H₁₂Li₂N₂O₁₀S₃) è un sale di dilizio 4-Amino-N-(3-[vinilsulfonil]fenil) naftilammide-3,6-disulfonato, spesso utilizzato come tracciante cellulare altamente fluorescente per identificare modelli di comunicazione giunzionale. Penetra in cellula mediante meccanismo di endocitosi in fase fluida.

Il test viene eseguito in *multiwell* da 6 pozzetti all'interno dei quali sono stati precedentemente inseriti i vetrini coprioggetto opportunamente sterilizzati; su di essi saranno rimaste adese le cellule che hanno differenziato spontaneamente (CTRL negativo) o in seguito ai trattamenti con TPA (CTRL positivo) e con gli hydrogels PAI e PVA. Si esegue il seguente protocollo:

- Si rimuove da ciascun pozzetto il terreno di coltura e le cellule rimaste adese al vetrino vengono lavate una volta con PBS (0,2 M, PH 7,4) (il lavaggio deve essere molto delicato, per evitare che si stacchino);
- si aspira il PBS del lavaggio e si inserisce in ciascun pozzetto 1 ml di soluzione di *Lucifer Yellow* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) alla concentrazione di 0,1 mg/ml in terreno di coltura al 10% di siero;
- si lascia ad incubare per 1 e 2 h a 37°C e al 5% di CO₂;
- al termine di ciascun tempo di incubazione, si rimuove la soluzione di *Lucifer Yellow* e si lavano le cellule con PBS 0,2 M, pH 7,4;
- si fissano le cellule con formalina al 4% in PBS per 5 min. e si effettua un lavaggio con PBS 0,2 M PH 7,4;
- si montano i vetrini con glicerina tamponata (glicerolo/PBS 1:1) e, una volta asciugati, si sigillano con Eukitt® (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)
- si osservano al microscopio a fluorescenza con filtro FITC (eccitazione 494 nm, emissione 518 nm).

3.10 Immunolocalizzazioni

Le cellule U937 e THP-1 sono state piastrate alla concentrazione di 2×10^5 / pozzetto in multiwell da 6 con i rispettivi trattamenti (CTRL negativo, TPA, PAI e PVA) e lasciate ad incubare per 48 e 72 h. In ciascun pozzetto erano stati precedentemente inseriti vetrini coprioggetto sterili. La marcatura infatti viene eseguita, allo scadere dei tempi di incubazione, sia sulle cellule rimaste adese al vetrino che su quelle in sospensione.

CD 14

Per questo tipo di marcatura si è utilizzato un anticorpo *FITC-Conjugated Monoclonal Mouse Anti-Human CD14* (DAKO, Denmark) diluito 1:10 con PBS 0,2 M pH 7,4.

Protocollo per cellule adese:

- Le cellule vengono lavate 3 volte con PBS 0,2 M pH 7,4, delicatamente per evitare che si stacchino;
- si bagna il vetrino con circa 50 µl della soluzione di CD14 e si lascia agire per 30 min. a 4°C ;
- si lava 3 volte con PBS;
- si fissano le cellule con formalina al 4% in PBS per 5 min., al termine dei quali si effettuano 3 lavaggi;
- si montano i vetrini con glicerina tamponata (glicerolo/PBS 1:1) e, una volta asciugati, si sigillano con Eukitt[®] (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)
- si osservano al microscopio a fluorescenza con filtro FITC (eccitazione 494 nm, emissione 518 nm).

Protocollo per cellule in sospensione:

- la sospensione cellulare aspirata da ciascun pozzetto viene centrifugata (800 rpm per 7-8 min) in modo da allontanare il terreno di coltura;
- si effettua 1 lavaggio in PBS;
- si risospende il pellet in 100 µl di soluzione di CD14 1:10 in PBS;
- si lascia agire per 30 min. a 4°C;
- si effettuano 3 lavaggi in PBS;
- si fissa con formalina al 4% in PBS per 5 min., al termine dei quali si effettuano altri 3 lavaggi;
- si fa uno *spot* (circa 20 µl) su vetrino portaoggetto con la sospensione cellulare corrispondente a ciascun trattamento e si lascia asciugare

overnight;

- si montano i vetrini con glicerina tamponata (glicerolo/PBS 1:1) e, una volta asciugati, si sigillano con Eukitt[®] (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)
- si osservano al microscopio a fluorescenza con filtro FITC (eccitazione 494 nm, emissione 518 nm).

CD31 e CD36

Sono stati utilizzati gli anticorpi primari *mouse monoclonal antibody CD36* (Santa Cruz Biotechnology, INC.) e *goat polyclonal antibody PECAM-1 (CD31)* (Santa Cruz Biotechnology, INC.) diluiti 1:50 in PBS 0,2 M pH 7,4; come anticorpo secondario si è utilizzato *anti-mouse IgG FITC conjugate* (Sigma, St. Louis, MO), diluito 1:50 in PBS 0,2 M pH 7,4.

Il protocollo è lo stesso utilizzato per la marcatura dell'antigene CD14, eccetto per il fatto che è necessario effettuare due incubazioni di 30 min. a 4°C, una con l'anticorpo primario ed una con quello secondario FITC-coniugato; tali incubazioni devono essere precedute e seguite dagli opportuni lavaggi in PBS come descritto precedentemente.

CD 68

L'immunolocalizzazione del *marker* CD68 si differenzia da quelle sopra descritte poiché richiede un passaggio di permeabilizzazione della membrana cellulare, dal momento che il CD68 è localizzato soprattutto a livello intracitoplasmatico e in misura minore sulla superficie dei monociti/macrofagi.

Si è utilizzato l'anticorpo primario *mouse monoclonal CD68* (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) diluito 1:50 in BSA-PBS 3%; come anticorpo secondario è stato utilizzato *anti-mouse IgG FITC conjugate* (Sigma, St. Louis, MO), diluito 1:50 in BSA-PBS 3%.

Protocollo per cellule adese:

- Le cellule rimaste adese sul vetrino vengono lavate delicatamente con PBS (1-2 volte) e fissate in formalina al 4% in PBS per 5 min;
- dopo la fissazione si esegue un lavaggio in PBS e si effettua la permeabilizzazione in metanolo ghiacciato (1 min. a -20°C);
- si effettua 1 lavaggio in BSA-PBS 3%;
- si effettua l'incubazione con l'anticorpo primario per 30 min. a temperatura ambiente (circa 20 µl per vetrino), a cui segue un lavaggio in BSA-PBS 3%;
- si effettua l'incubazione con l'anticorpo secondario FITC-coniugato per 30 min. a temperatura ambiente, a cui segue un lavaggio in BSA-PBS 3%;
- si montano i vetrini con glicerina tamponata (glicerolo/PBS 1:1) e, una volta asciugati, si sigillano con Eukitt[®] (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO);
- si osservano al microscopio a fluorescenza con filtro FITC (eccitazione 494 nm, emissione 518 nm).

Protocollo per cellule in sospensione:

- La sospensione cellulare viene allontanata da ciascun pozzetto e centrifugata a 800 rpm per 7-8 min;
- Il pellet cellulare viene lavato 1 volta in PBS, fissato in formalina al 4% in PBS per 5 min. e nuovamente lavato;
- si effettua la permeabilizzazione con metanolo ghiacciato (1 min. a -20°C) a cui segue 1 lavaggio in BSA-PBS 3%;
- si effettua l'incubazione con l'anticorpo primario per 30 min. a temperatura ambiente, a cui segue un lavaggio in BSA-PBS 3%;
- si effettua l'incubazione con l'anticorpo secondario FITC-coniugato per 30 min. a temperatura ambiente, a cui segue un lavaggio in BSA-PBS 3%;
- i pellet vengono sospesi in BSA-PBS 3% e con essi si effettuano gli *spot* (circa 20 µl) sui vetrini e si lasciano asciugare *over night*;

- si montano i vetrini con glicerina tamponata (glicerolo/PBS 1:1) e, una volta asciugati, si sigillano con Eukitt[®] (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)
- si osservano al microscopio a fluorescenza con filtro FITC (eccitazione 494 nm, emissione 518 nm).

3.11 Test ELISA

ELISA è l'acronimo inglese per Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, un metodo di analisi immunologica ampiamente utilizzato per rilevare la presenza di svariate molecole all'interno di campioni biologici (siero, urina), ma non solo; esso infatti può essere applicato, come nel nostro caso, anche ai sistemi di colture cellulari in vitro.

Il test si basa sulla specificità di legame che si instaura tra un anticorpo specifico e la molecola di interesse (Lai Y. et al., 2005). Tale test trova un ampio uso nella diagnostica clinica: ad esempio viene utilizzato per misurare la concentrazione plasmatica di anticorpo anti-HIV e consente dunque di diagnosticare un'eventuale sieropositività nel paziente.

In questo lavoro di tesi sono stati utilizzati i kit DuoSet[®] ELISA (R&D Systems, Abingdon, UK) per quantificare le citochine pro-infiammatorie TNF- α , IL-1 β e IL-6 nel surnatante di colture cellulari monocitiche/macrofagiche opportunamente trattate per diversi tempi; allo scadere dei vari tempi di incubazione i surnatanti sono stati raccolti, centrifugati per eliminare residui cellulari e congelati a -20°C in attesa di eseguire i test.

I kit che abbiamo utilizzato si basano sulla cosiddetta metodica ELISA “non competitiva diretta”; essa prevede l'utilizzo di un anticorpo primario ancorato ad una fase solida (micropiastra in polistirene) che riconosce una specifica molecola, e di un anticorpo secondario biotinitato. Entrambi si legano alla molecola di interesse formando il cosiddetto *sandwich* (fig. 3.4). Tale complesso viene rilevato introducendo una soluzione contenente streptavidina (si lega alla biotina) a sua volta coniugata all'enzima perossidasi che metabolizzerà un opportuno substrato (tetrametilbenzidina, TMB), rilasciando un precipitato di colore blu. La reazione

verrà bloccata attraverso l'introduzione di acido solforico che farà virare il colore della soluzione dal blu al giallo. L'intensità del prodotto di reazione giallo risultante verrà misurata spettrofotometricamente a 450 nm.

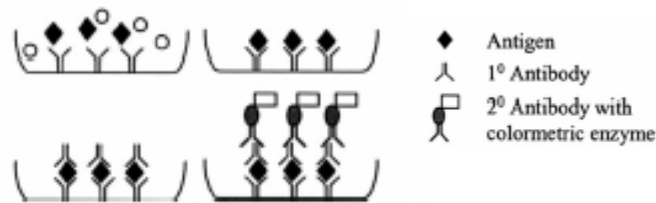


Fig 3.4: sandwich ELISA (da Lai Y. *et al.*, 2005)

Per ciascun test è stato seguito il protocollo fornito dalla R&D *Systems*, che prevede una prima fase (fase di *coating*) in cui si prepara la micropiastra lasciando che l'anticorpo primario (*capture antibody*, C.A.) si leghi al fondo e alla pareti dei micropozzetti, ed una seconda fase in cui si saggiano i campioni mediante l'aggiunta dell'anticorpo secondario (*detection antibody*, D.A.).

La quantificazione della molecola di interesse avviene per "estrapolazione" da una curva standard con sette punti (fig. 3.6), ottenuta graficando concentrazioni note dello standard incluso nel kit, ottenute per diluizione seriale a partire da una concentrazione nota più elevata (fig. 3.5), in funzione delle corrispondenti densità ottiche.

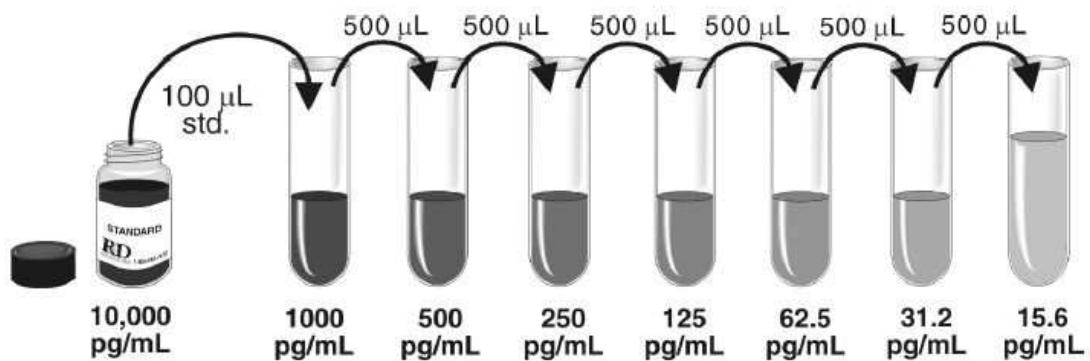


Fig 3.5: diluizioni seriali ottenute a partire da una concentrazione nota di molecola standard (da www.rndsystems.com).

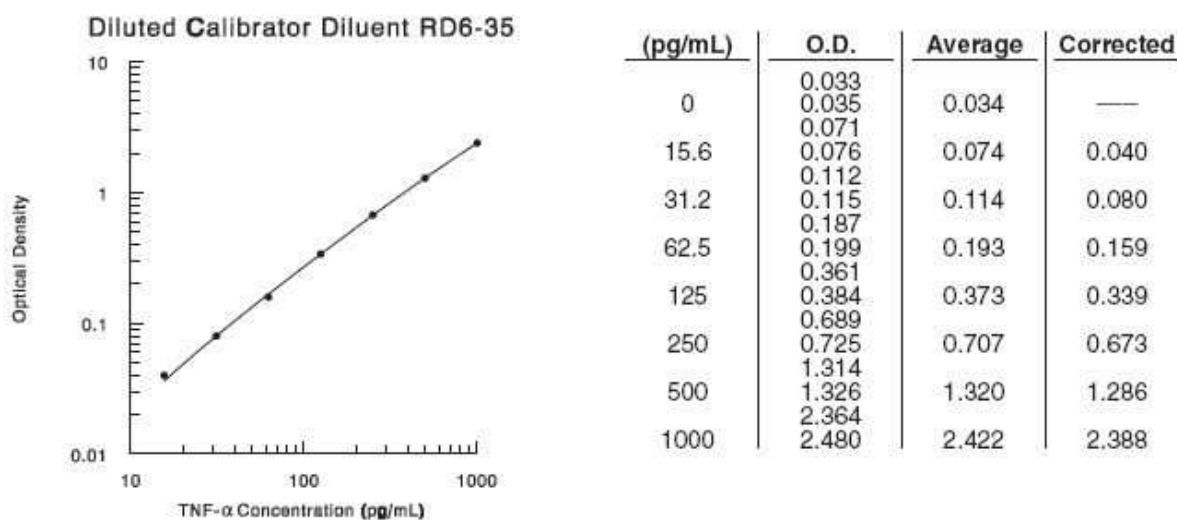


Fig 3.6: esempio di curva standard, in scala logaritmica, ottenuta graficando concentrazioni note di standard di TNF- α in funzione delle corrispondenti densità ottiche (da www.rndsystems.com).

Le soluzioni richieste per l'esecuzione del test ELISA sono le seguenti:

PBS - 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄ (pH 7.2-7.4)

Wash Buffer - 0,05% Tween[®] 20 (Sigma, St. Louis, MO) in PBS

Reagent Diluent – 1% BSA in PBS

Streptavidina-HRP – 1:200 in Reagent Diluent

Substrate Solution - Miscela 1:1 di reagente colorato A (H₂O₂) e reagente colorato B (Tetrametilbenzidina) (R&D Systems Catalog, DY999)

Stop Solution – 2 N H₂SO₄

Le concentrazioni di utilizzo degli anticorpi e degli standard relativi sono le seguenti:

TNF- α

C.A.: 4 μ g/ml in PBS;

D.A.: 250 ng/ml in Reagent Diluent;

Standard: 1000-500-250-125-62.5-31.25-15.6 (pg/ml) in Reagent Diluent.

IL-1 β

C.A.: 4 $\mu\text{g/ml}$ in PBS;

D.A.: 200 ng/ml in Reagent Diluent;

Standard: 250-125-62.5-31.25-15.6-7.8-3.9 (pg/ml) in Reagent Diluent.

IL-6

C.A.: 2 $\mu\text{g/ml}$ in PBS;

D.A.: 200 ng/ml in Reagent Diluent;

Standard: 600-300-150-75-37.5-18.75-9.3 (pg/ml) in Reagent Diluent.

Preparazione della micropiastra:

- Inserire in ciascun pozzetto della micropiastra 100 μl di *Capture Antibody* opportunamente diluito e lasciare ad incubare *overnight* a temperatura ambiente;
- aspirare la soluzione da ciascun pozzetto ed effettuare tre lavaggi con Wash Buffer (400 $\mu\text{l/well}$);
- dopo aver aspirato l'ultimo dei tre lavaggi, dispensare in ciascun pozzetto il Reagent Diluent (300 $\mu\text{l/well}$) e lasciare agire per 1h a temperatura ambiente;
- aspirare la soluzione da ciascun pozzetto ed effettuare tre lavaggi con Wash Buffer.

Assay Procedure:

- dopo aver aspirato l'ultimo dei tre lavaggi dispensare nei pozzetti i campioni da saggiare e gli standard (100 $\mu\text{l/well}$); coprire la piastra e incubare per 2 h a temperatura ambiente;
- aspirare la soluzione da ciascun pozzetto ed effettuare tre lavaggi con Wash Buffer;
- dopo aver aspirato l'ultimo dei tre lavaggi, dispensare in ciascun pozzetto il *Detection Antibody* opportunamente diluito (100 $\mu\text{l/well}$), coprire la piastra e lasciare agire per 2 h a temperatura ambiente;

- aspirare la soluzione da ciascun pozzetto ed effettuare tre lavaggi con Wash Buffer;
- dopo aver aspirato l'ultimo dei tre lavaggi aggiungere in ogni pozzetto 100 µl di soluzione di Streptavidina-HRP opportunamente diluita e lasciare agire per 20 min. al riparo dalla luce;
- aspirare la soluzione da ciascun pozzetto ed effettuare tre lavaggi con Wash Buffer;
- Dispensare in ciascun pozzetto 100 µl di Substrate Solution e lasciare agire per 20 min. al riparo dalla luce;
- Stoppare la reazione con 2 N H₂SO₄ (50 µl/well) e leggere la piastra ad una lunghezza d'onda di 450 nm (lettore di micropiastre SORIN BIOMEDICA ETI-System).

3.12 Dosaggio dell'ossido nitrico (NO)

Per misurare la quantità di NO presente nel surnatante di cellule opportunamente trattate si è utilizzato un saggio colorimetrico che si basa sull'impiego del "reattivo di Griess"; tale reagente contiene due composti chimici, ossia acido sulfanilico (Reagente B) e N-(1-naftalenediamina) (Reagente A): in ambiente acido, il reagente B viene convertito dal nitrito (NO₂⁻) in sale di diazonio che rapidamente si lega al reagente A formando una molecola la cui assorbanza viene letta spettrofotometricamente a 540 nm (fig. 3.7).

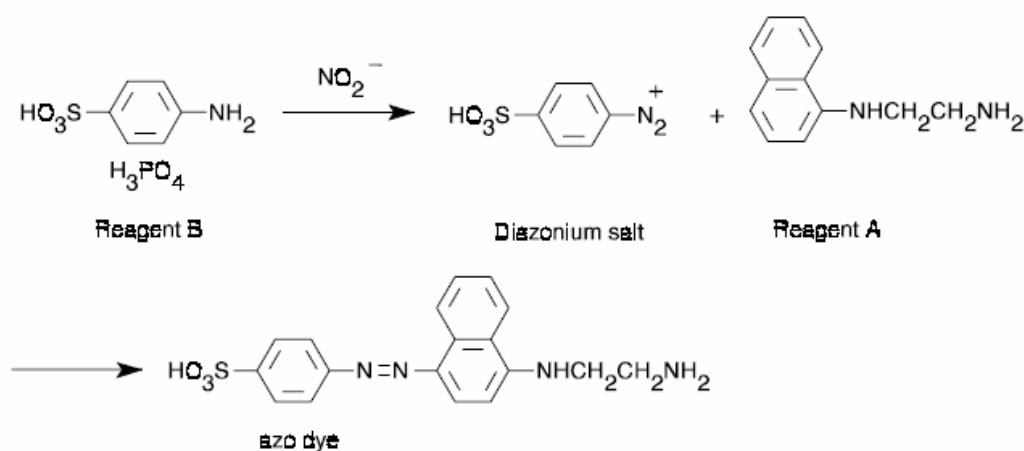


Fig 3.7: reazione chimica su cui si basa il saggio di Griess (descritta da Griess nel 1879).

Dunque i livelli di NO vengono misurati in modo indiretto attraverso la quantificazione del nitrito che è stabile e non volatile ed è il primo dei due prodotti che si originano dalla rottura di NO.

Protocollo:

- mescolare in parti uguali (1:1) il surnatante cellulare ed il reattivo di Griess (Sigma, St. Louis MO);
- lasciare agire per 15 minuti;
- leggere allo spettrofotometro (DU 640B *Spectrophotometer*, Beckman-Coulter) a 540 nm.

Le concentrazioni di NO vengono calcolate per estrapolazione da una curva standard costruita graficando concentrazioni note dello standard di nitrito di sodio (100-50-25-12,5-6,25-3,13-1,56 μM) in funzione delle corrispondenti densità ottiche.

3.13 Preparativa SEM

Questa metodica consente di preparare i campioni biologici per l'osservazione al microscopio elettronico a scansione (SEM) preservando le loro caratteristiche originarie che devono rimanere quanto più possibile vicine a quelle dell'ambiente fisiologico; a questo scopo si effettuano due passaggi principali: la fissazione delle proteine e dei lipidi con glutaraldeide e tetrossido di osmio, e la disidratazione graduale in alcoli (o acetone), in modo da eliminare tutta l'acqua presente nel campione per evitare che durante l'osservazione essa evapori, provocando la contrazione e dunque l'alterazione della struttura della specie biologica.

Un ulteriore passaggio chiamato CPD (Critical Point Drying) permette di vaporizzare il solvente organico inserendo il campione, già fissato e disidratato, in un contenitore ad alta pressione che viene riempito con CO₂ liquida a temperatura ambiente e chiuso ermeticamente; successivamente si aumenta la temperatura al di sopra di un valore critico (critical point) con conseguente aumento della pressione. Quando la pressione raggiunge un certo livello, la CO₂ da liquida diventa gassosa e

viene rilasciata gradualmente dal contenitore mediante l'apertura di una valvola: ciò determina la completa disidratazione dei campioni.

Infine i campioni vengono montati su "stubs" in alluminio e ricoperti con oro (sputtering) per permettere la conduzione degli elettroni durante l'osservazione finale.

In questo lavoro di tesi tale metodica è stata utilizzata per preparare campioni di Poliuretano sui cui sono state fatte aderire diverse tipologie cellulari (U937, THP-1 e RAW 264.7) per 72 h. Il protocollo è il seguente:

- Lavaggi in tampone cacodilato 0,1 M (3 x 5');
- Fissazione in glutaraldeide 2,5% in tamp. cacodilato per 1+ ½ h;
- Lavaggi in tampone cacodilato 0,1 M (3 x 5');
- Post-fissazione in OsO₄ 1% in tamp. cacodilato per 2 + ½ h a 4°C;
- Lavaggi in tampone cacodilato 0,1 M (3 x 5');
- Alcol al 50% (15');
- Alcol al 70% O.N. a 4°C;
- Alcol al 90% (3 x 15');
- Alcol al 100% (3 x 15');
- CPD: 2 cicli da 30'', 1 ciclo da 40'', 1 ciclo da 50'' (Critical Point Dryer Balzers 030, Balzers, Leichtenstein)
- *Sputtering* (Balzers SCD 050, Balzers, Leichtenstein)

I campioni così preparati sono stati osservati al microscopio elettronico a scansione Philips XL20.

3.14 Analisi statistica dei dati

I risultati sono espressi come medie \pm deviazione standard per ogni tipo di campione testato. I valori medi derivano da esperimenti ripetuti tre volte ciascuno.

Dopo aver valutato se vi sono differenze significative tra i valori relativi ai diversi campioni mediante l'analisi della varianza ad una via (ANOVA), le differenze tra gruppi sono stabilite mediante il test del *t*-Student applicato a due popolazioni indipendenti. La significatività è considerata ad una probabilità $p < 0.05$.

4. RISULTATI

4.1 Analisi citotossicologiche

Hydrogels

La vitalità delle linee cellulari RAW 264.7, THP-1 e U937 dopo differenti tempi di incubazione (24, 48 e 72 h) con i biopolimeri polialchilimide (PAI) e polivinilalcol (PVA) è stata saggiata mediante i test colorimetrici MTT e Neutral Red.

I risultati relativi alle cellule **RAW 264.7**, espressi come valori di densità ottica, sono riportati nel grafico di fig. 4.1.

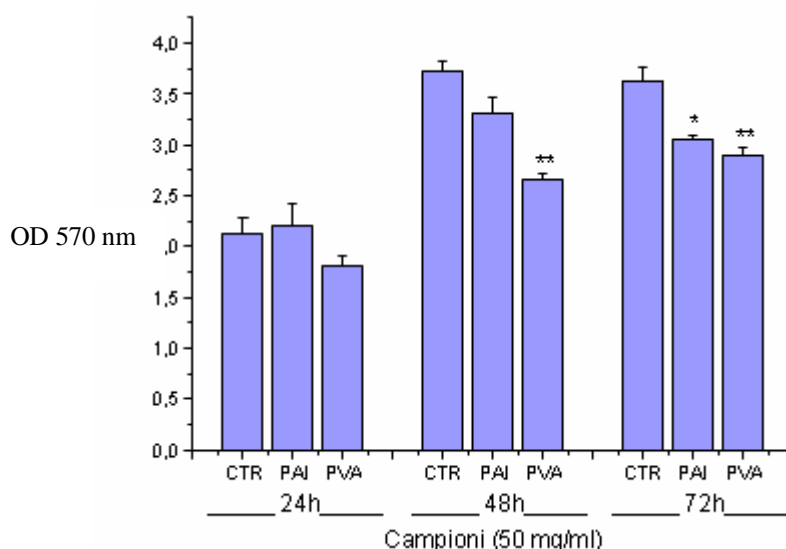


Fig. 4.1: test MTT eseguito sui macrofagi RAW 264.7 dopo 24, 48 e 72 h di incubazione con i polimeri PAI e PVA (50 mg/ml). I valori sono espressi come media \pm dev. st.di di tre esperimenti indipendenti effettuati in triplicato. Analisi statistica rispetto al CTR (controllo negativo): * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Si può osservare che i macrofagi sono sempre vitali e proliferano dopo 24 ore. L'abbassamento dei valori di densità ottica riscontrati per le cellule cresciute in presenza dei polimeri dopo 48 e 72 ore sono da attribuirsi soprattutto al fatto che lo spazio a disposizione delle cellule sulla piastra di coltura è inferiore quando sono presenti i polimeri, poiché ne occupano una certa area. La vitalità delle cellule RAW 264.7 è confermata dalle osservazioni al microscopio ottico dove le cellule assumono una colorazione scura poiché metabolizzano l'MTT, confermando che sono metabolicamente attive (fig. 4.2).

La colorazione con blu di toluidina, effettuata sia sulle cellule presenti nel pozzetto di coltura (fig. 4.3), che su quelle che rimangono adese ai polimeri (fig. 4.4), ha evidenziato una morfologia comparabile al controllo negativo. Le cellule hanno perlopiù forma sferica, in qualche caso assumono una forma più allungata; non si osservano cellule giganti (FBGC). Le immagini microscopiche rivelano la presenza di poche cellule adese ai polimeri (fig. 4.4); probabilmente ciò è dovuto alla loro elevata idrofilicità (Nagaoka S. *et al.*, 1990).

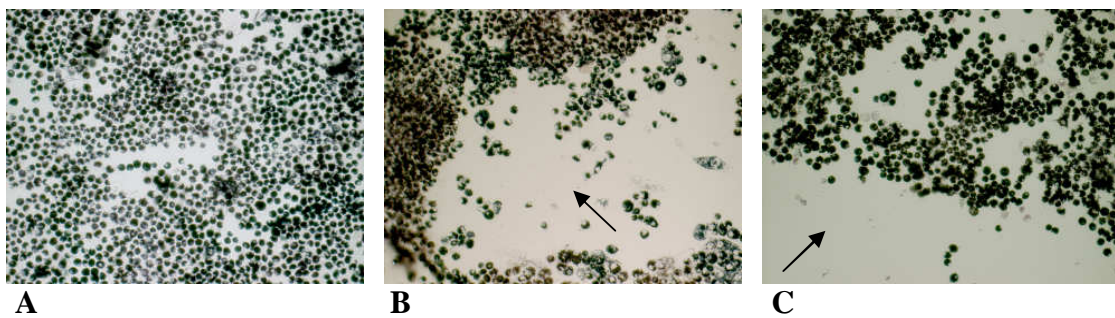


Fig. 4.2: immagini microscopiche di cellule RAW 264.7 che hanno metabolizzato il sale MTT dopo 48 h di trattamento con i biopolimeri. A) controllo negativo, B) PAI, C) PVA. Le frecce indicano la posizione dei polimeri nella piastra di coltura. Ingrandimenti originali 20X.

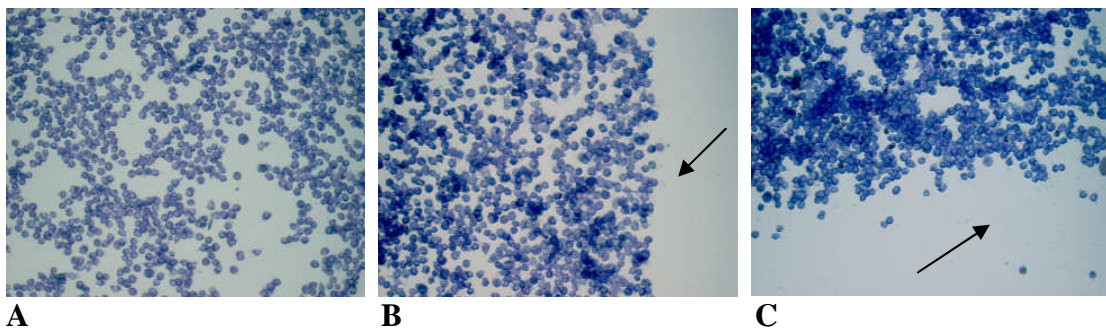


Fig 4.3: colorazione con blu di toluidina di macrofagi RAW 264.7 incubati per 48 h con i polimeri. A) controllo negativo, B) PAI, C) PVA. Le frecce indicano la posizione dei polimeri nella piastra di coltura. Ingrandimenti originali 20X.

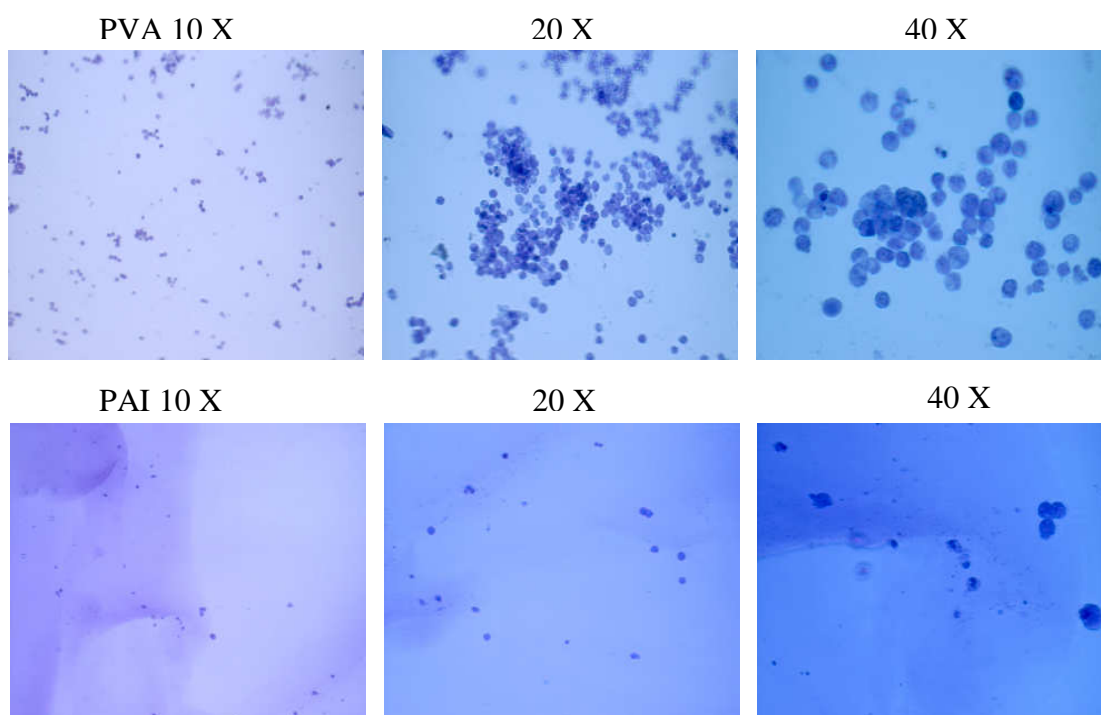
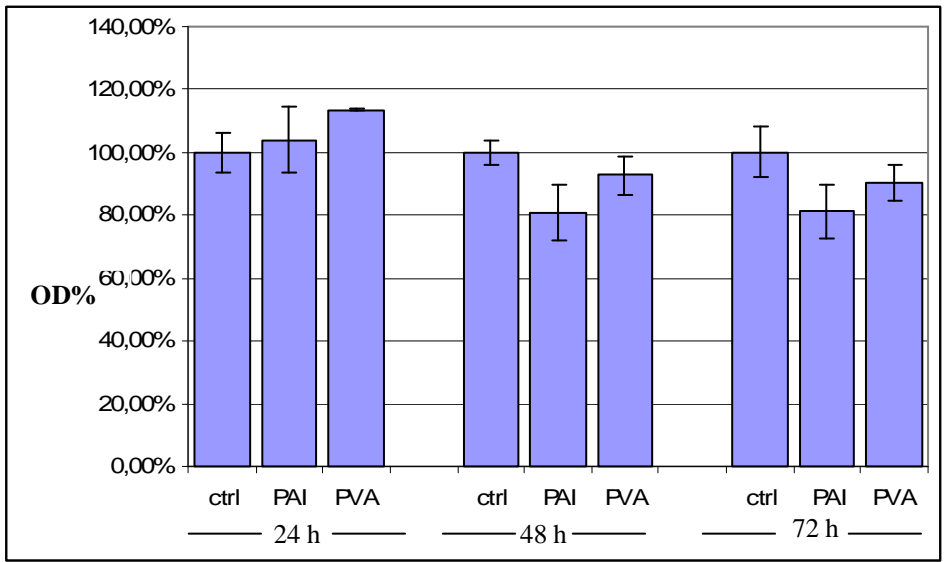


Fig. 4.4: polimeri PAI e PVA colorati con blu di toluidina.

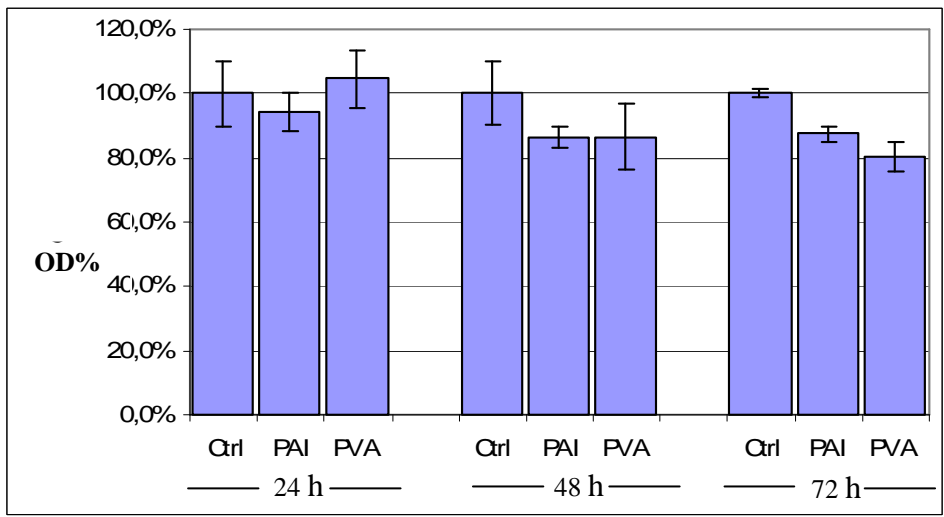
L'analisi della citotossicità effettuata sui monociti **THP-1** è stata condotta in tre tempi (24, 48 e 72 ore) come per le RAW 264.7 ed, inoltre, in differenti condizioni ambientali, ossia in assenza ed in presenza di fibronectina, una proteina della matrice extracellulare che mima l'ambiente fisiologico (fig. 4.5).

I risultati evidenziano che la vitalità delle THP-1 si mantiene elevata in presenza di entrambi gli hydrogels, dal momento che non si osservano differenze significative nei valori di assorbanza percentuale rispetto alle cellule non trattate (CTRL negativo). Un lieve calo di vitalità si riscontra alle 48 e 72 ore; anche in questo caso ciò è dovuto, come già visto per le RAW 264.7, al fatto che le cellule proliferano ma hanno a disposizione un'area limitata del pozzetto di coltura, essendo una buona parte di tale area occupata dai polimeri. La presenza di fibronectina non influisce sulla vitalità cellulare.

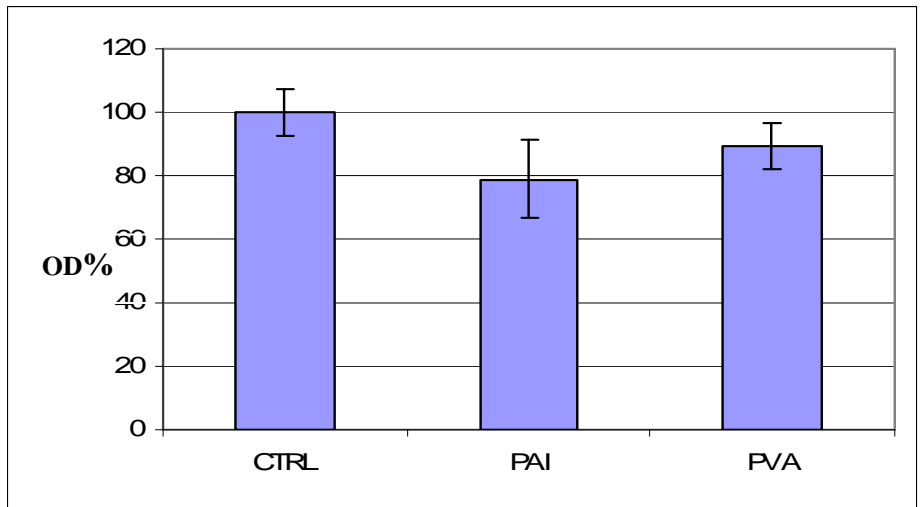
Il test Neutral Red, eseguito dopo 48 ore, conferma l'assenza di citotossicità nei trattati con i polimeri.



A



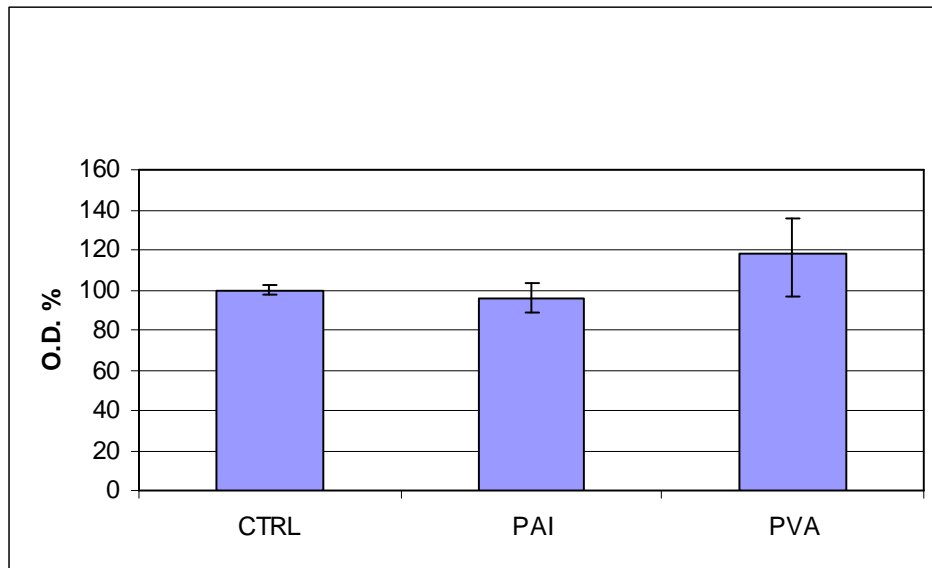
B



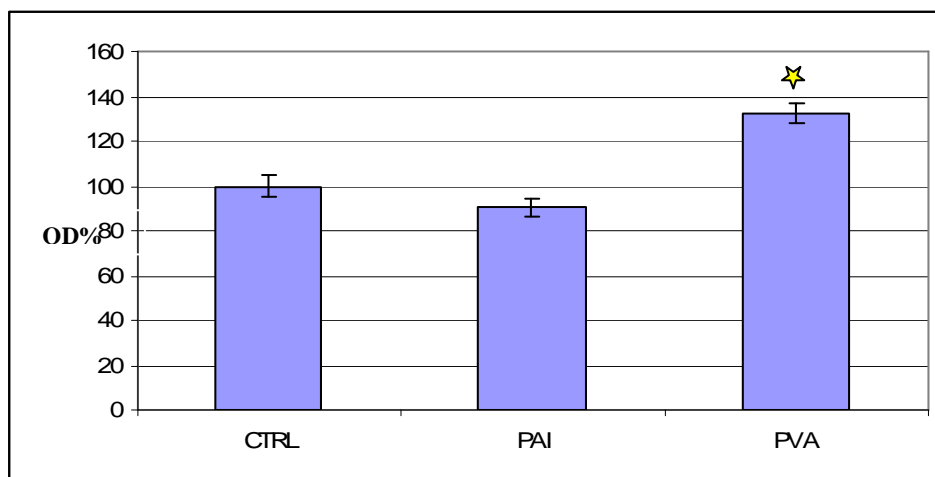
C

Fig. 4.5: test MTT di cellule THP-1 incubate per 24, 48 e 72 ore con PAI e PVA (50 mg/ml) in assenza (A) ed in presenza (B) di fibronectina. Test Neutral Red effettuato dopo 48 ore (C). I valori sono stati normalizzati rispetto al controllo, che è stato considerato come 100%, e sono la media \pm dev. st. di tre esperimenti indipendenti effettuati in triplicato.

I test di citotossicità MTT e Neutral Red effettuati sui promonociti **U937** dopo 48 ore di incubazione con PAI e PVA hanno confermato l'elevata biocompatibilità dei due polimeri dal momento che entrambi non influiscono sulla vitalità di queste cellule.



A



B

Fig. 4.6: MTT (A) e Neutral Red (B) di cellule U937 incubate per 48 h con PAI e PVA (50mg/ml), in assenza di fibronectina. I valori sono stati normalizzati rispetto al controllo negativo, che è stato considerato come 100%, e rappresentano la media \pm dev. st. di tre esperimenti indipendenti effettuati in triplicato. Analisi statistica: * $p < 0.05$ rispetto al controllo negativo.

Poliuretano

Le analisi di citotossicità effettuate mediante test MTT dopo 72 ore di incubazione delle cellule RAW 264.7, THP-1 e U937 con il poliuretano (diametro circa 1 cm) (fig. 4.7) rivelano che la vitalità di tutte e tre le linee cellulari si mantiene elevata in presenza del polimero; ciò è confermato anche dalle osservazioni al microscopio ottico delle cellule vitali che hanno accumulato al loro interno il sale formazano e appaiono perciò di colore blu scuro (le immagini si riferiscono alle sole cellule THP-1) (fig. 4.8).

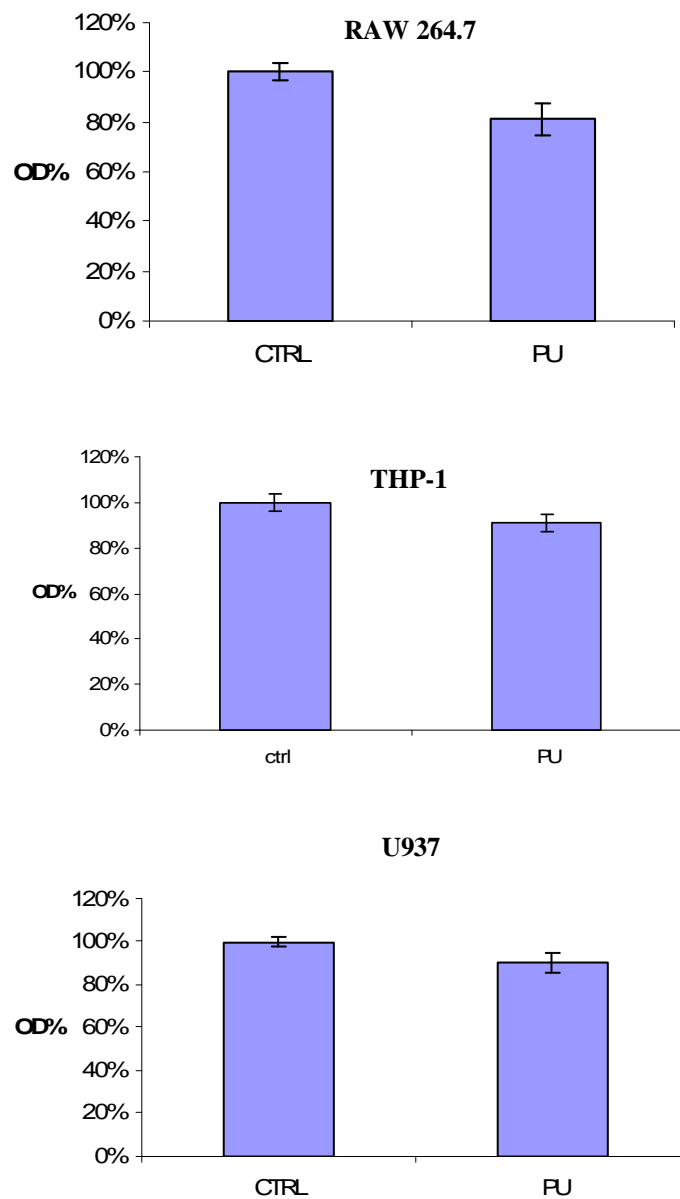


Fig. 4.7: test MTT di cellule RAW 264.7, THP-1 e U937 incubate per 72 ore con poliuretano. I valori sono stati normalizzati rispetto al CTRL negativo che è stato considerato come 100% e rappresentano la media \pm dev. st. di tre esperimenti indipendenti effettuati in triplicato.

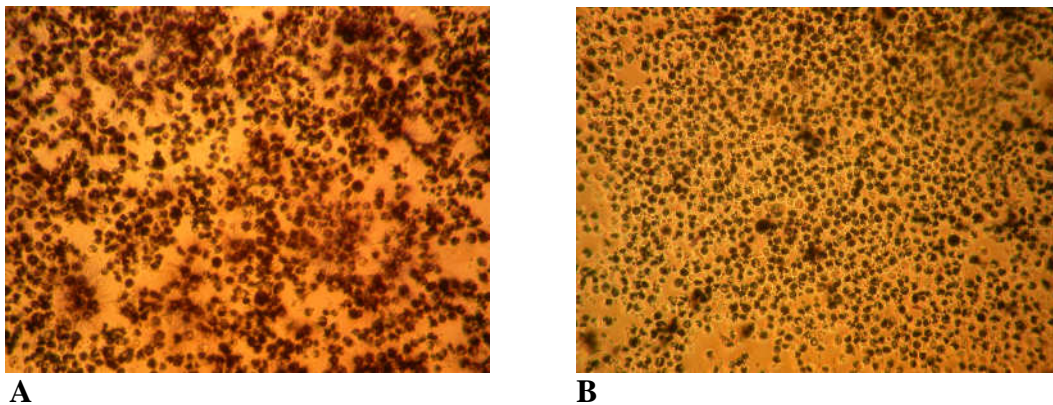


Fig. 4.8: immagini di cellule THP-1 sottoposte al test MTT. Le cellule incubate per 72 h con poliuretano (B) appaiono vitali (intensa colorazione blu) tanto quanto le cellule di controllo (A). Ingrandimenti originali 20X.

4.2 Osservazioni morfologiche

Hydrogels

Lo studio della morfologia cellulare è indispensabile per valutare la biocompatibilità dei polimeri sintetici; eventuali alterazioni di tale morfologia possono indicare che un biomateriale è citotossico ancor prima di effettuare i test quantitativi descritti precedentemente. Inoltre, variazioni della forma cellulare in seguito al contatto con i biopolimeri possono essere segnali di un processo di differenziamento in atto. Alla luce di queste considerazioni, le cellule U937 e THP-1 sono state osservate accuratamente al microscopio ottico dopo diversi tempi di trattamento con PAI e PVA.

Le figure 4.9 e 4.10 si riferiscono alle cellule **U937** mantenute in coltura rispettivamente per 48 e 72 ore con gli hydrogels. Dopo 48 ore si osserva che le cellule di controllo presentano un aspetto tondeggiano tipico dei pro-monociti. In seguito al trattamento con l'agente differenziante TPA (controllo positivo), si ha la perdita dei contorni regolari e l'emissione di lunghi pseudopodi. Le U937 trattate con PAI mostrano contorni irregolari, quelle trattate con PVA esprimono caratteristiche di maturazione, ovvero forma allungata e primi accenni di estroflessioni.

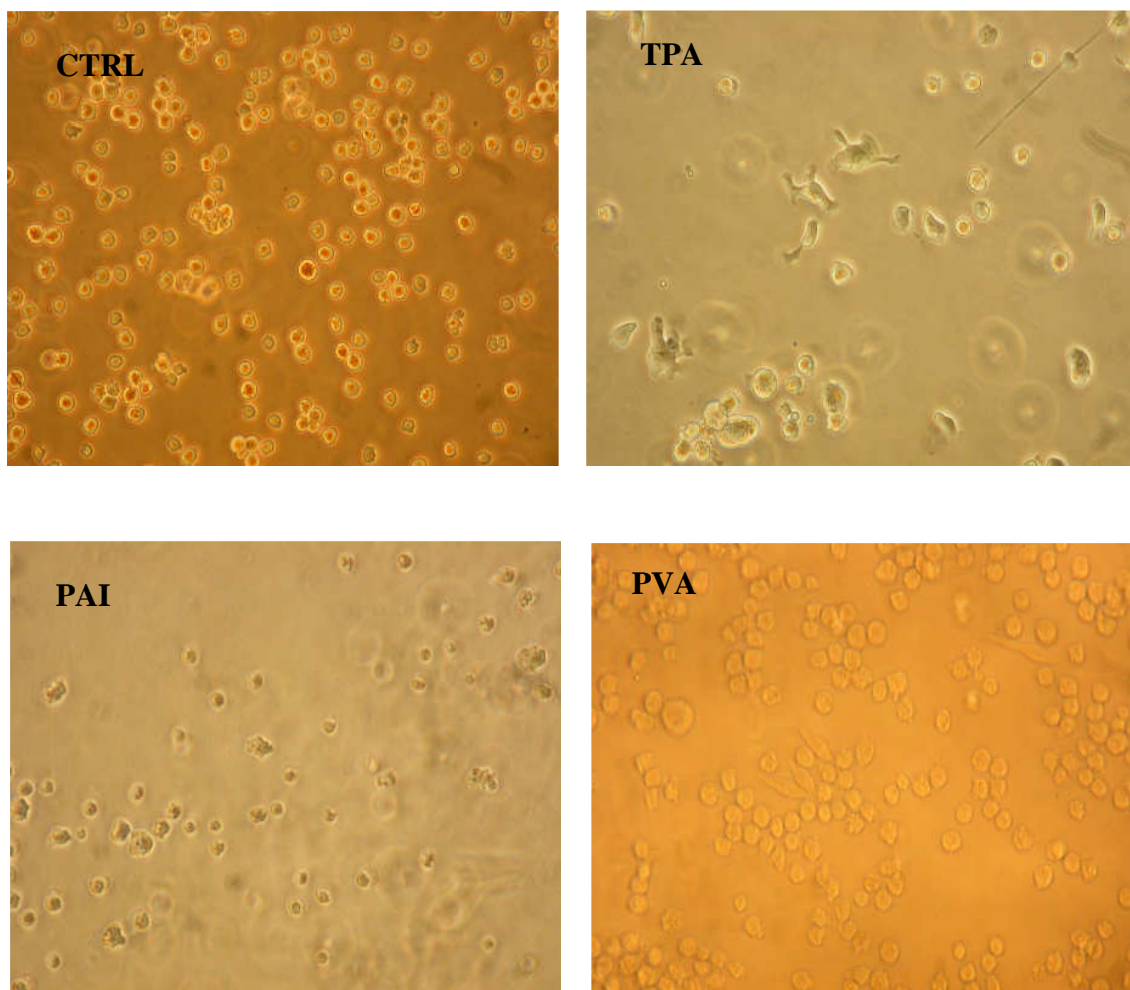


Fig. 4.9: immagini di cellule U937 incubate per 48 h con TPA e biopolimeri PAI e PVA, in presenza di fibronectina. Ingrandimenti originali 20X.

Dopo 72 ore, le cellule di controllo hanno proliferato conservando forma tondeggiante e rimanendo in sospensione. Le U937 trattate con TPA presentano sottili e lunghe estroflessioni. Sono soprattutto le U937 trattate con PVA a presentare caratteristiche di maturazione e a passare ad una crescita in adesione. Le cellule incubate con PAI mantengono contorni irregolari, ma senza emettere pseudopodi.

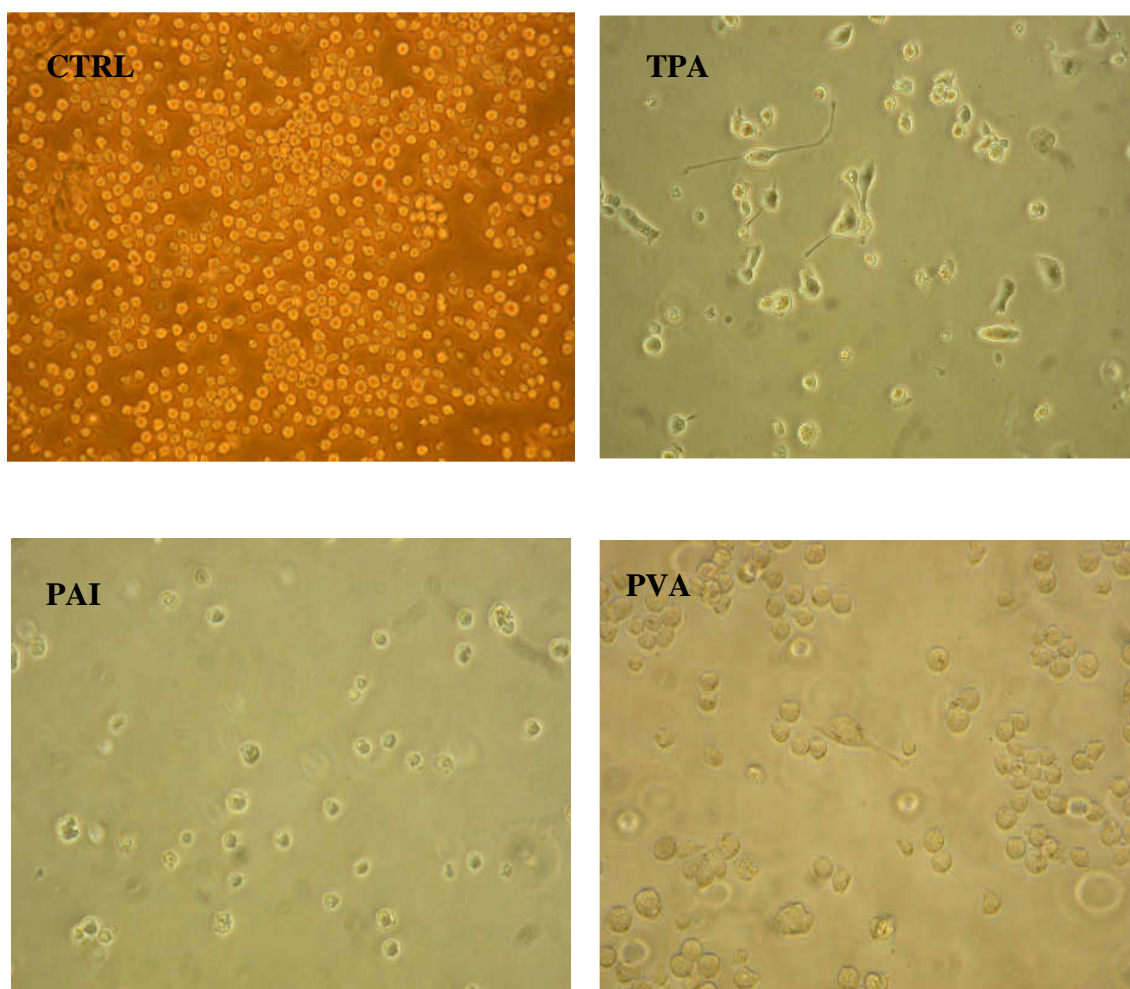


Fig. 4.10: immagini di cellule U937 incubate per 72 h con TPA e biopolimeri PAI e PVA, in presenza di fibronectina. Ingrandimenti originali 20X.

Le figure da 4.11 a 4.16 si riferiscono ai monociti THP-1 incubati per 24-48 e 72 ore con i trattamenti TPA, PAI e PVA in differenti condizioni ambientali, ossia in presenza ed in assenza di fibronectina.

Come si osserva in fig. 4.11, le cellule di controllo presentano un aspetto tondeggiante e trasparente, tipico dei monociti. In seguito al trattamento con l'agente differenziante TPA (controllo positivo), si osserva la perdita dei contorni regolari e l'emissione degli pseudopodi che determinano la transizione da una crescita perlopiù in sospensione a quella in adesione.

Le THP-1 trattate con i polimeri PAI e PVA mostrano caratteristiche di maturazione, ovvero contorni meno regolari e primi accenni di estroflessioni.

La colorazione con ematossilina-eosina dimostra che le cellule sono in buono stato di salute, poichè il nucleo viola appare regolare e non si osservano tracce di apoptosi o necrosi.

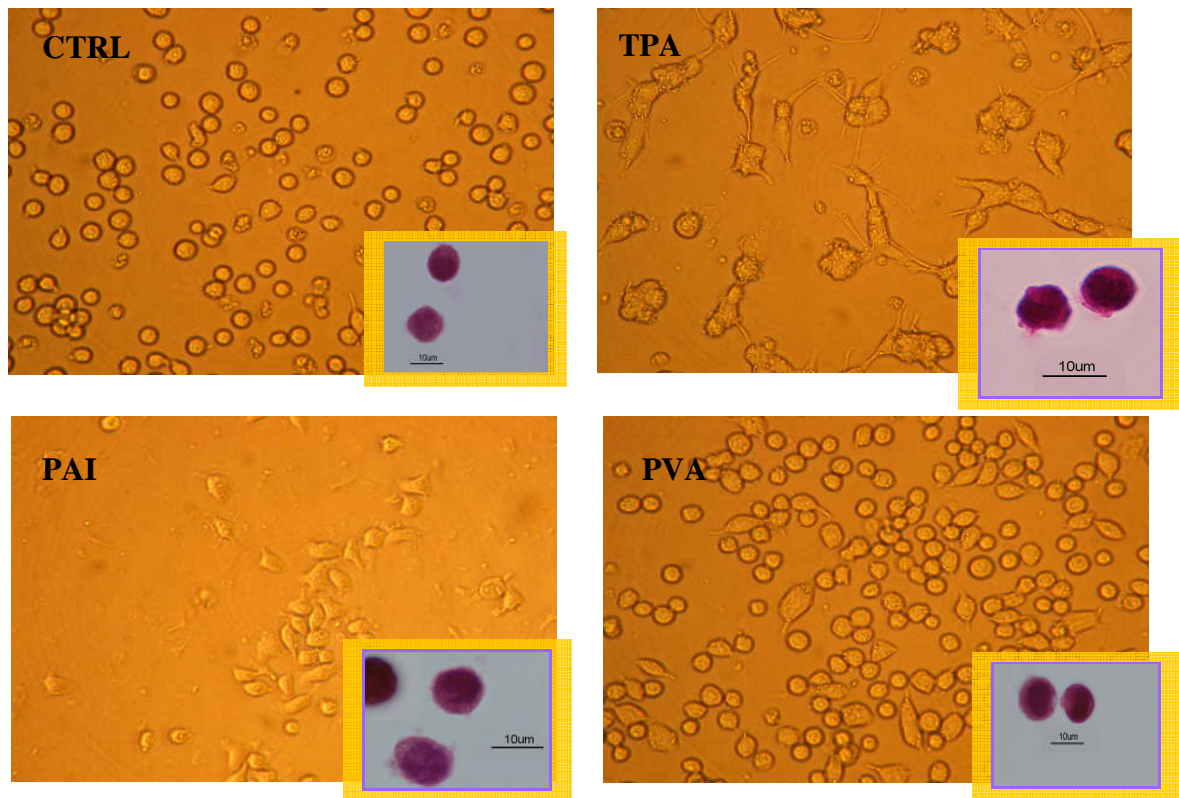


Fig. 4.11: immagini di monociti THP-1 mantenuti in coltura per 24 h con TPA, PAI e PVA in presenza di fibronectina. Ingrandimenti originali 20X.

Dopo 48 ore di incubazione (fig. 4.12), le THP-1 di controllo conservano contorni tondeggianti ed è evidente la loro crescita numerica dovuta ad una attiva proliferazione. Le THP-1 trattate con TPA sono del tutto adese e in numero inferiore rispetto al controllo, poichè l'agente differenziante determina il blocco del processo di proliferazione. Sia il trattamento con PAI che con PVA induce l'adesione cellulare. Infine, anche dopo 48 h con i vari trattamenti, le THP-1 godono di buono stato di salute.

Dopo 72 ore (fig. 4.13), si accentuano le caratteristiche morfologico-differenziative già descritte alle 48 ore per i trattamenti TPA, PAI e PVA.

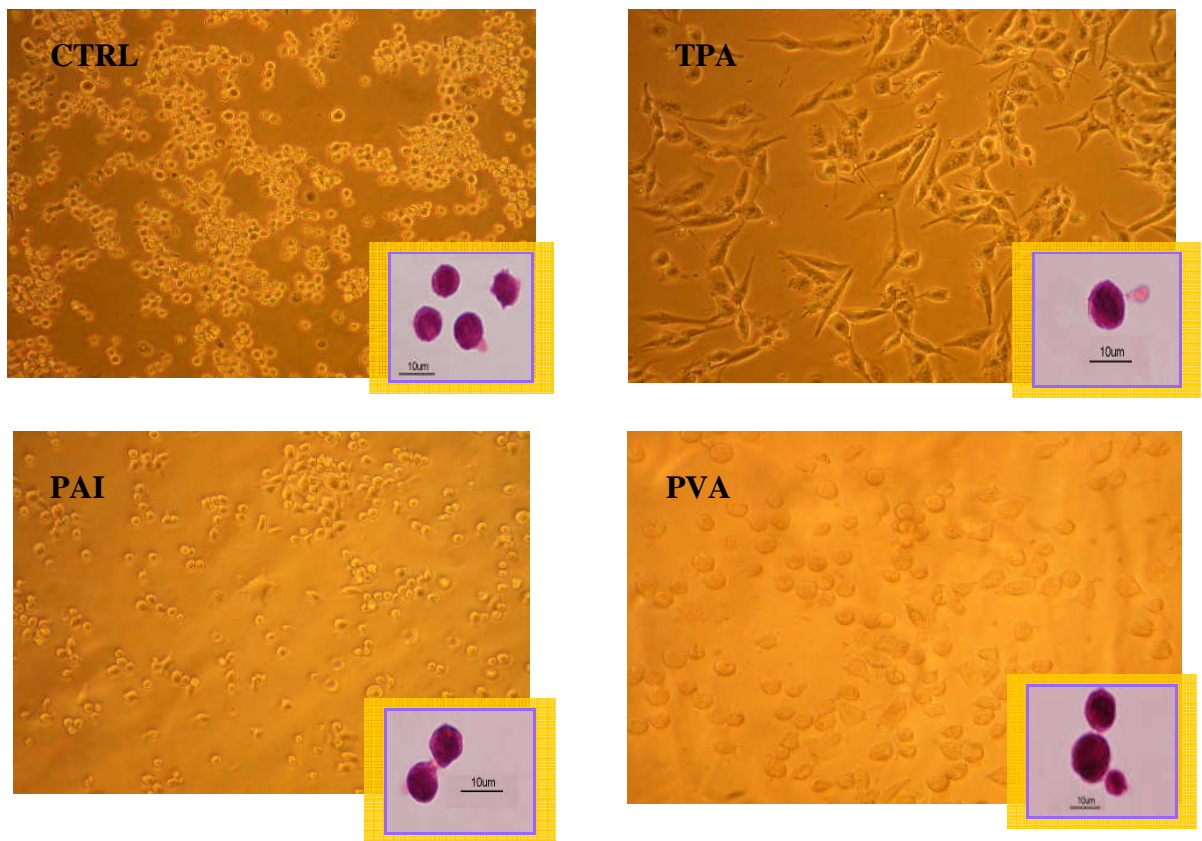


Fig. 4.12: immagini di monociti THP-1 mantenuti in coltura per 48 h con TPA, PAI e PVA in presenza di fibronectina. Ingrandimenti originali 20X.

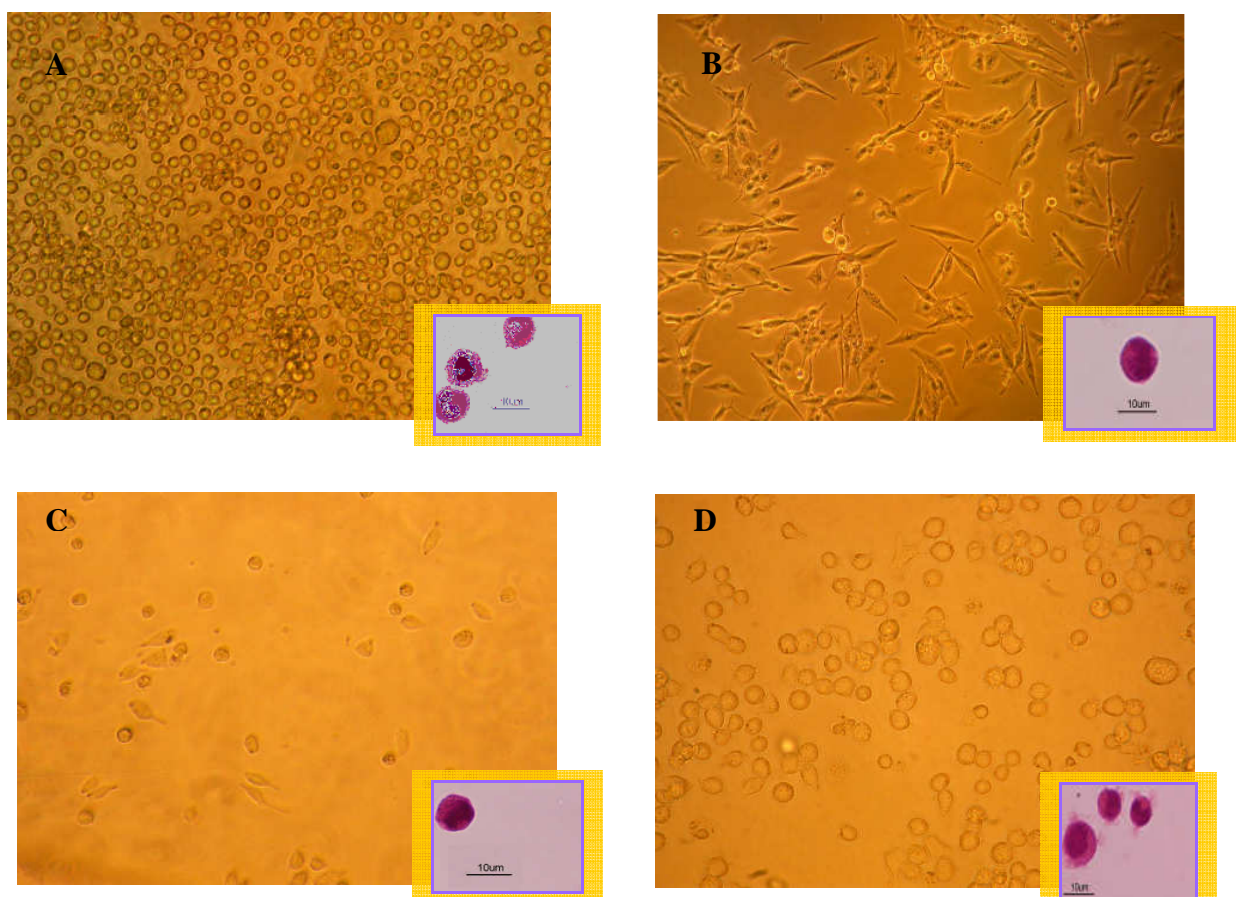
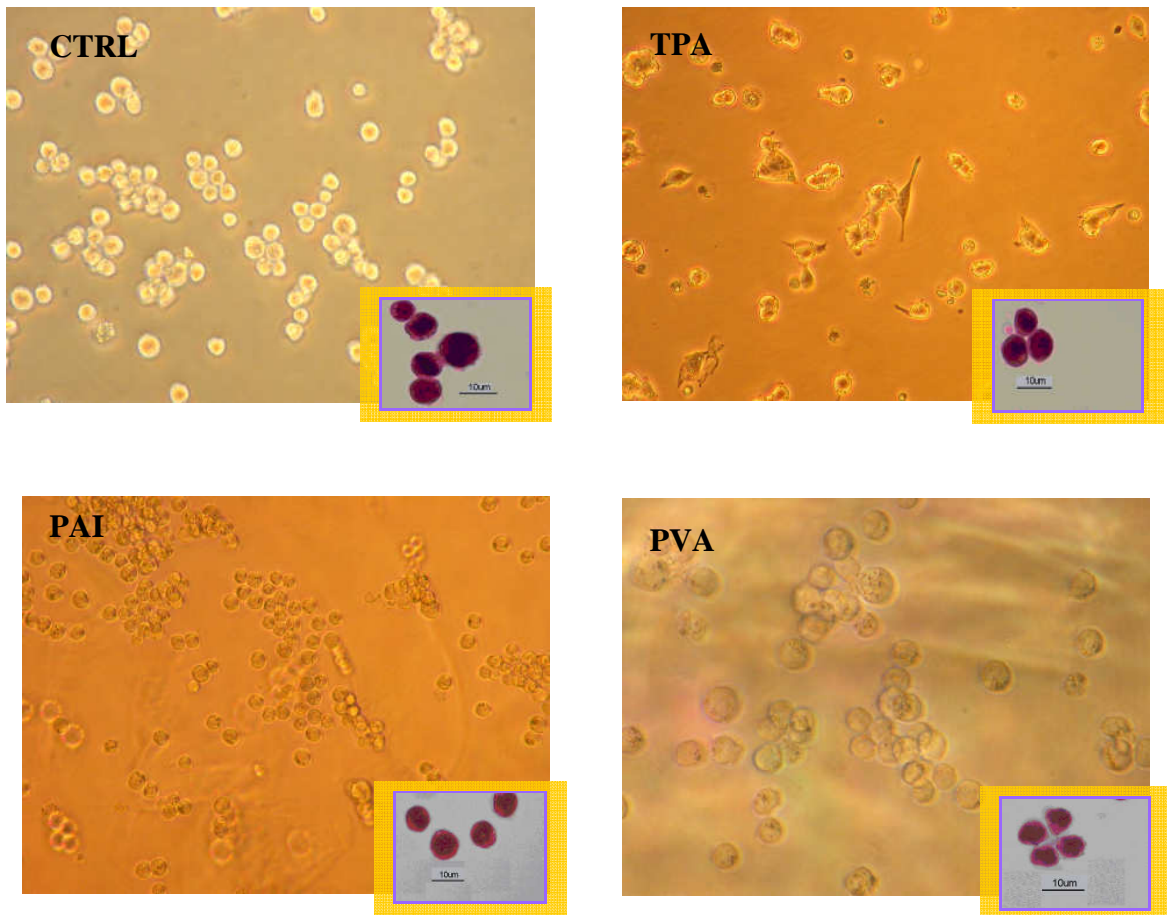


Fig. 4.13: immagini di cellule THP-1 mantenute in coltura per 72 h con TPA, PAI e PVA in presenza di fibronectina. Ingrandimenti originali 20X.

Nelle figure 4.14, 4.15 e 4.16 osserviamo le cellule THP-1 tenute in coltura con i rispettivi trattamenti in assenza di fibronectina. Si può notare come le cellule trattate con i polimeri PAI e PVA, passando dalle 24 alle 72 ore, rimangano adese sotto i polimeri, ma presentino una morfologia regolare che appare molto più simile a quella delle cellule di controllo piuttosto che a quella delle cellule differenziate con TPA. Pertanto, si può ipotizzare che sia l'azione sinergica della fibronectina e dei biopolimeri a favorire il passaggio delle cellule THP-1 dalla crescita in sospensione a quella in adesione; infatti in assenza del substrato di fibronectina ed in presenza dei soli biopolimeri le cellule non mostrano la caratteristica forma allungata indice di differenziamento.



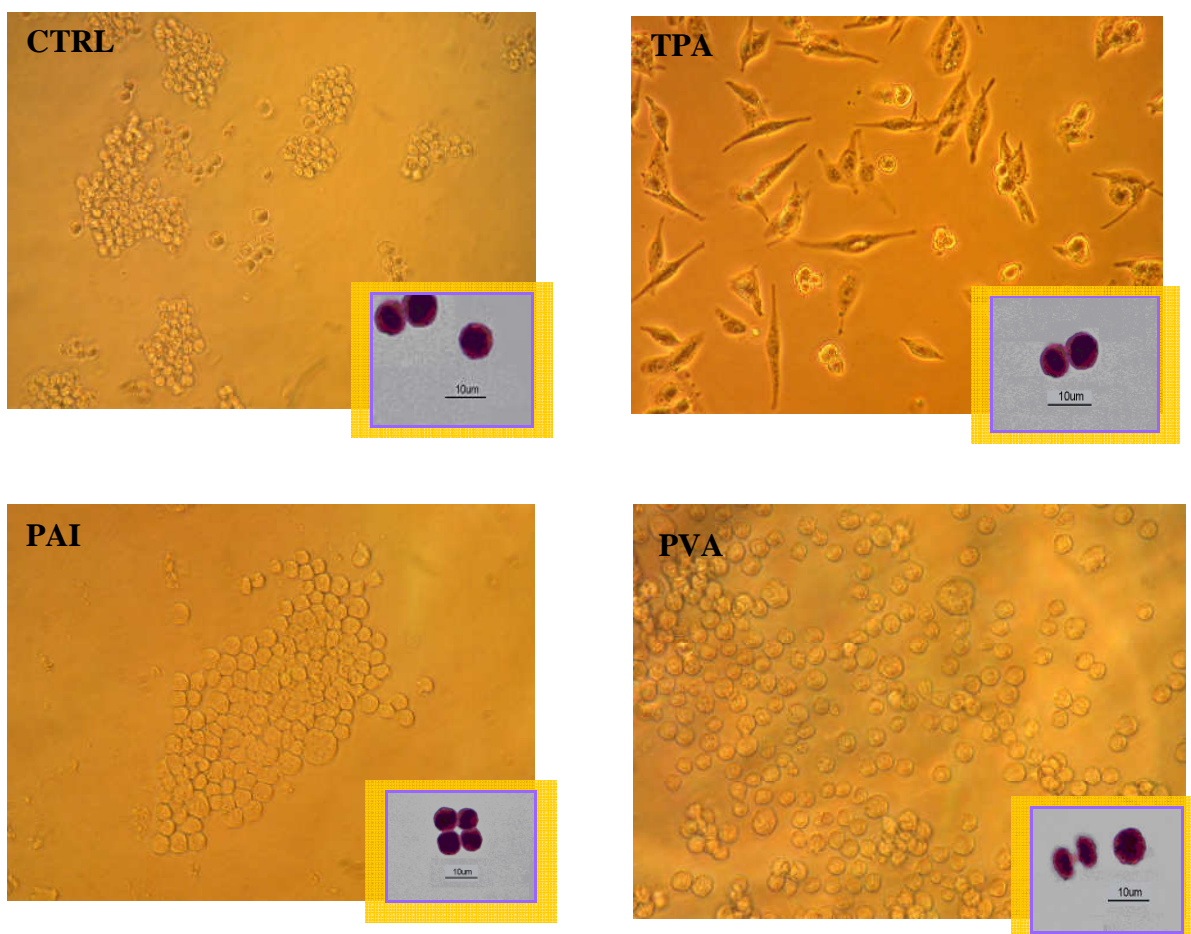


Fig. 4.15: immagini di cellule THP-1 mantenute in coltura per 48 h con TPA, PAI e PVA in assenza di fibronectina. Ingrandimenti originali 20X.

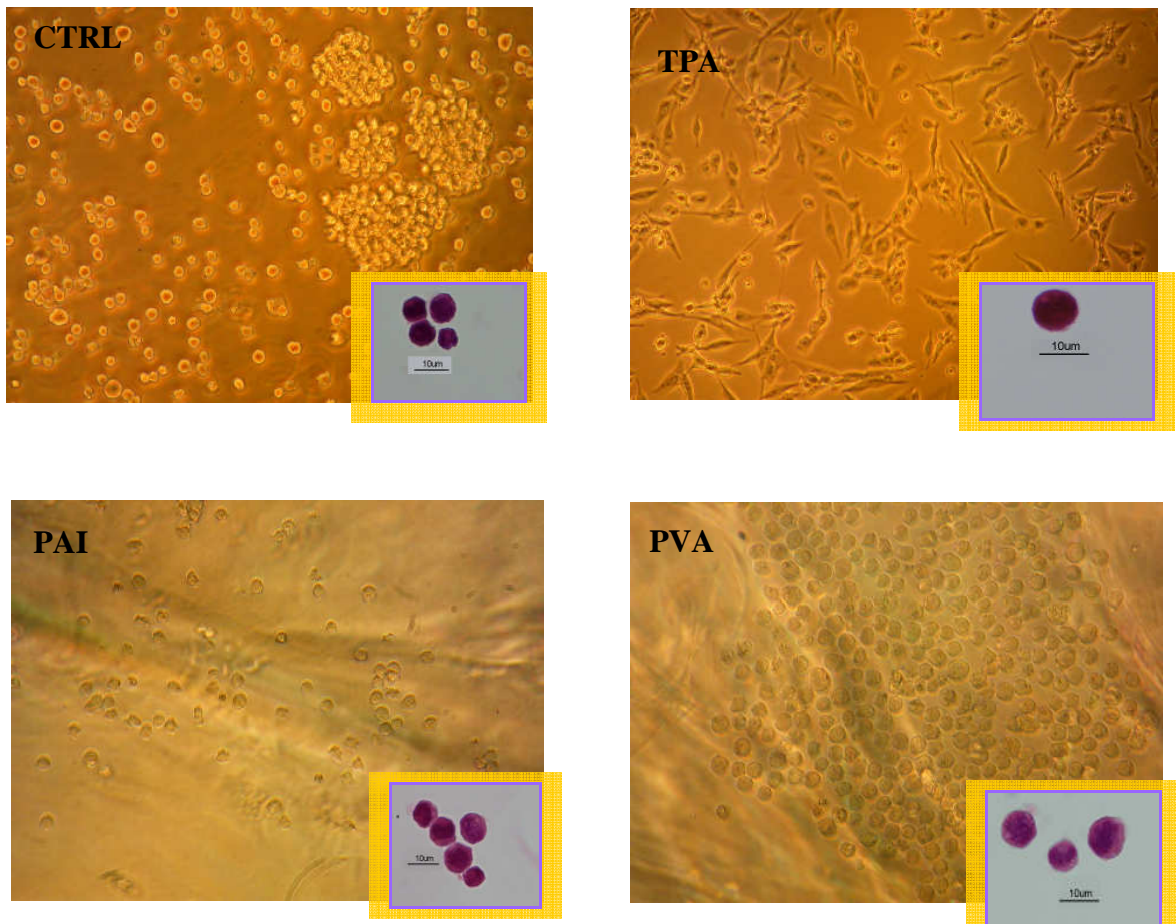


Fig. 4.16: immagini di cellule THP-1 mantenute in coltura per 72 h con TPA, PAI e PVA in assenza di fibronectina. Ingrandimenti originali 20X.

Poliuretano

Le osservazioni morfologiche relative al poliuretano hanno permesso di evidenziare le caratteristiche topografiche delle sue due diverse superfici e l'adesione cellulare al biomateriale. L'analisi preliminare al microscopio ottico invertito permette di distinguere una superficie "liscia" (fig. 4.17A) ed una porosa (fig. 4.17B).

Per valutare la citocompatibilità di questo materiale, cioè il grado di adesione cellulare ad esso, sono state adottate due strategie sperimentali, ossia lo stereomicroscopio e il S.E.M; infatti, l'elevato spessore del PU e l'assenza di trasparenza non avrebbero permesso di valutare al microscopio ottico eventuali cellule adese.

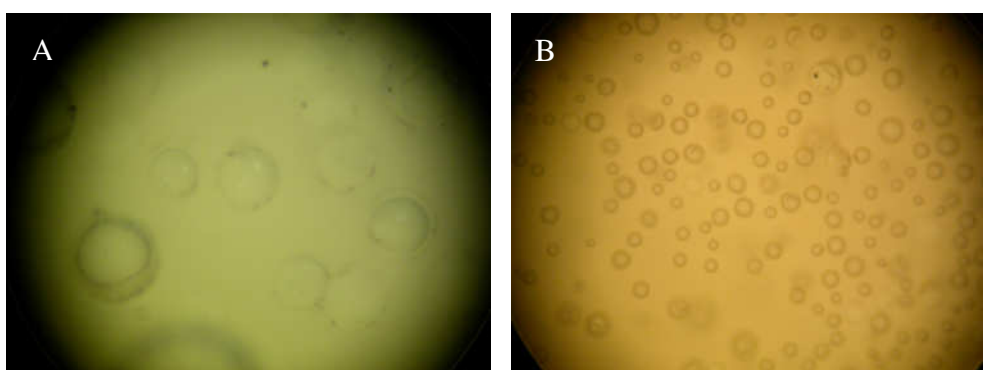


Fig. 4.17: superficie liscia (A) e porosa (B) del poliuretano. Ingrandimenti 40X.

Le osservazioni allo stereomicroscopio del polimero colorato con ematossilina-eosina dopo incubazione di 72 ore con cellule THP-1 ha permesso di verificare che nel caso della superficie porosa (fig. 4.18A) molti sono i puntini blu che si osservano, al contrario sulla superficie liscia sono molto rari (fig. 4.18B). Questi puntini rappresentano le cellule adese alla superficie porosa del PU, che risulta senz'altro più citocompatibile.

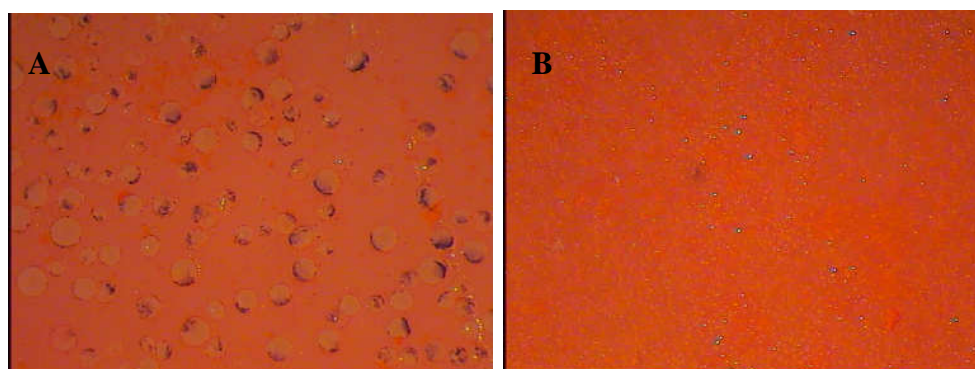


Fig 4.18: osservazioni allo stereomicroscopio di cellule THP-1 che hanno aderito alla superficie porosa (A) del poliuretano. La superficie liscia (B) non presenta adesione cellulare. Colorazione con ematossilina-eosina.

Dalle osservazioni al S.E.M appare evidente come la superficie liscia del PU non presenti cellule adese (fig. 4.19), ma piuttosto sembra che si formino alcune strutture simili a “crateri” che collassano su se stesse creando numerose cavità con diametro medio di circa 18 μm , all'interno delle quali si accumulano detriti (fig. 4.20).

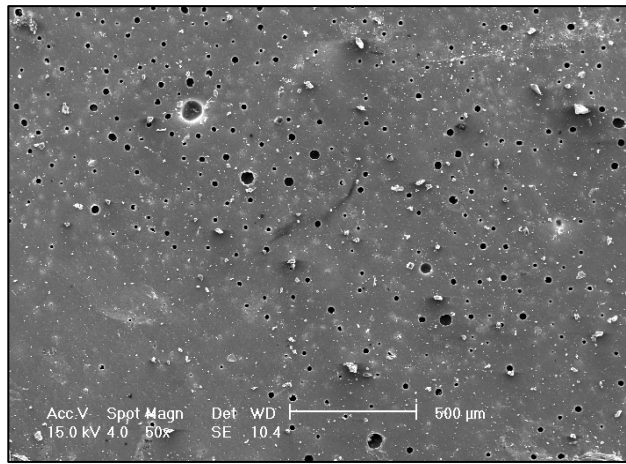


Fig 4.19: fotografia al SEM della superficie liscia del poliuretano. Ingrandimento 50X.

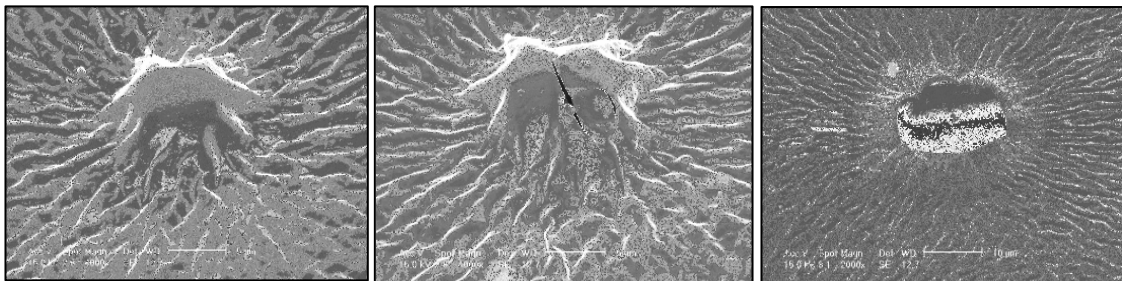


Fig. 4.20: fotografie al SEM delle cavità presenti sulla superficie liscia del poliuretano. Ingrandimento 4000X.

La superficie porosa, caratterizzata da pori con diametro medio di 180 μm , si dimostra estremamente citocompatibile. E' molto interessante notare il diverso comportamento delle tre linee cellulari, dal momento che le RAW 264.7 preferiscono aderire nelle aree che separano i pori (fig. 4.21A), mentre le U937 (fig. 4.21B) e le THP-1 (fig. 4.21C) si distribuiscono al loro interno. Il conteggio delle cellule RAW e U937 in adesione effettuato su 5 campi con ingrandimento 80X per l'una e per l'altra linea ci ha permesso di effettuare un'analisi statistica dalla quale risulta chiaramente che il comportamento delle due linee è significativamente differente, dal momento che l'80% circa delle RAW si distribuisce nelle zone tra un poro e l'altro, contro solo l'8% delle U937; quest'ultime viceversa si addensano maggiormente all'interno dei pori (92%), posizionandosi prevalentemente sul fondo di ogni cavità (77%); viceversa, le poche cellule RAW che si distribuiscono nei pori (18%) preferiscono aderire sui loro bordi (16%) e non all'interno (2%) (tabella in fig. 4.22). Le cellule a contatto con il poliuretano sono in perfetto stato di salute, come possiamo osservare dai particolari in fig. 4.23 e 4.24.

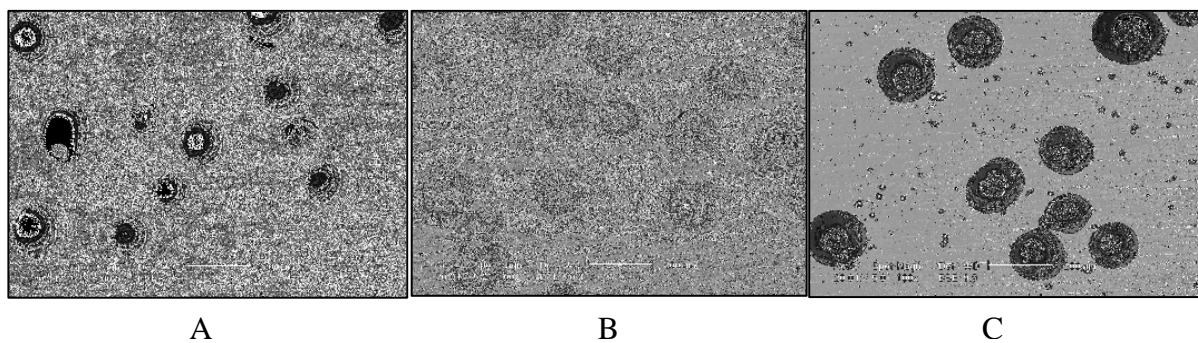


Fig. 4.21: Immagini al SEM di cellule RAW 264.7 (A), U937 (B) e THP-1 (C) che hanno aderito alla superficie porosa del poliuretano. Ingrandimenti 100X.

	% cell. fuori	% cell. nei pori	
RAW	<u>82 %</u>	18 % (6 cell./poro)	16 % nei bordi
			2 % dentro
U937	* 8 %	* <u>92 %</u> (23 cell./poro)	15 % nei bordi
			77 % dentro

Fig 4.22: tabella relativa alle conte di cellule RAW e U937 che hanno aderito nelle diverse aree della superficie porosa del poliuretano. Analisi statistica effettuata con test ANOVA, significatività rispetto alla percentuale di cellule RAW che hanno aderito * $p < 0,01$.

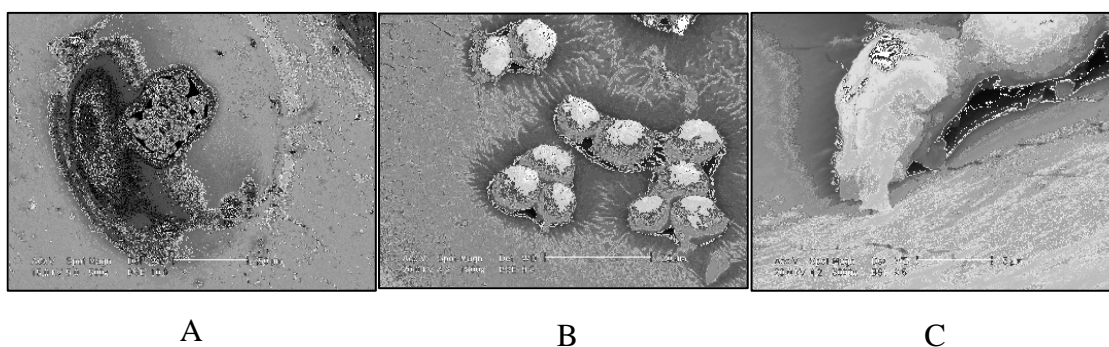


Fig.4.23: particolare di monciti THP-1 che hanno aderito all'interno di un poro con ingrandimenti 500X (A), 1800X (B) e 5000X (C).

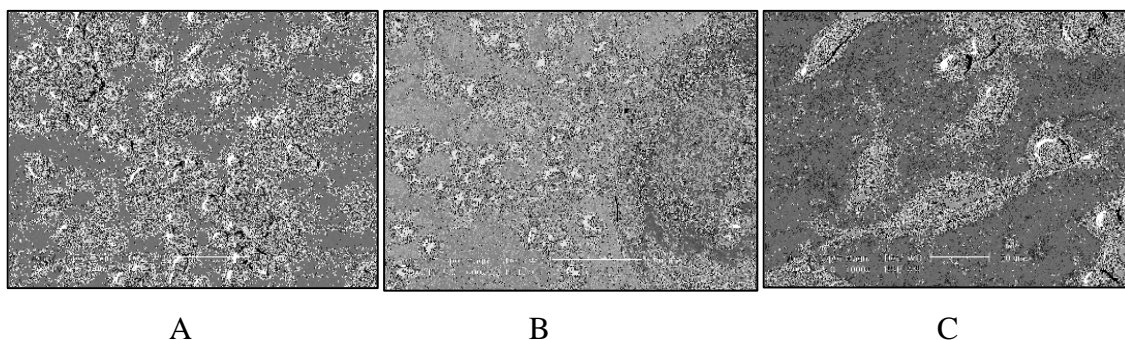


Fig. 4.24: particolare di macrofagi RAW 264.7 con ingrandimenti 500 X (A), 600 (B) e 1000X (C).

4.3 Attivazione macrofagica

Hydrogels

Al fine di valutare l'attivazione dei monociti/macrofagi posti a contatto per diversi tempi con i polimeri PAI e PVA sono stati analizzati diversi parametri. Una prima valutazione, relativa al passaggio cellulare da una crescita in adesione a quella in sospensione, è stata effettuata nel paragrafo precedente. Gli altri aspetti valutati sono stati il rilascio di anioni superossidi da parte dei macrofagi attivati (test NBT), le variazioni della distribuzione degli antigeni di superficie (immunolocalizzazioni), la capacità cellulare di legare e/o internalizzare corpi estranei (test di endocitosi in fase fluida e test di fagocitosi con particelle di latex) ed infine la reattività immunologica cellulare (test ELISA).

Test NBT

Il test è stato effettuato sulle cellule U937 e THP-1 mantenute in coltura per 72 ore in presenza dei polimeri e di fibronectina. I risultati evidenziano il diverso comportamento dei due hydrogels in funzione del tipo di linea cellulare. Infatti, nelle U937 è il PAI a dimostrare un potere differenziante maggiore, al contrario nelle THP-1 è il PVA ad avere un valore di assorbanza paragonabile a quello dell'agente differenziante TPA utilizzato come controllo positivo.

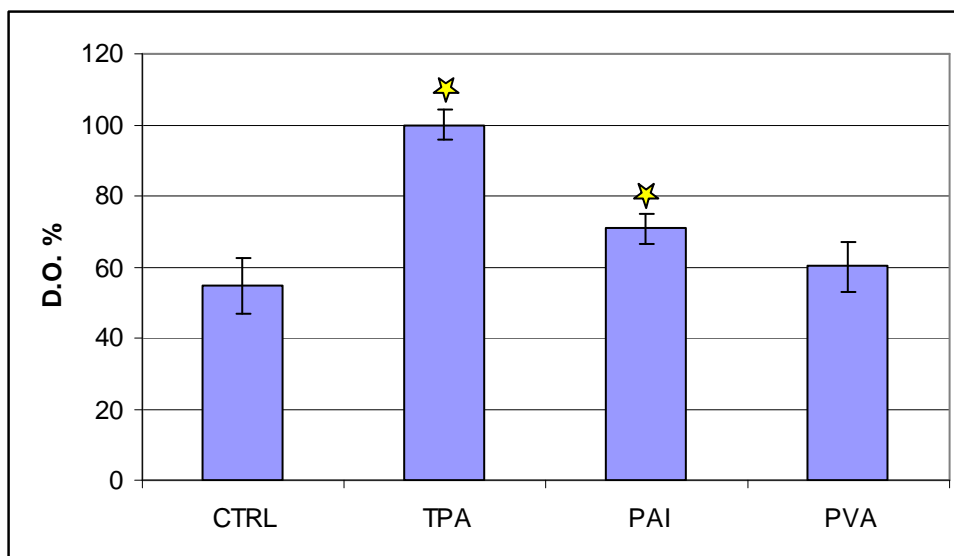


Fig. 4.25: NBT di cellule U937 incubate per 72 h in presenza di TPA, PAI e PVA. I valori sono stati normalizzati rispetto al TPA, che è stato considerato come 100%, e sono la media \pm dev. st. di tre esperimenti indipendenti effettuati in triplicato.

★ significatività rispetto al controllo negativo (CTRL) $p < 0,05$ %.

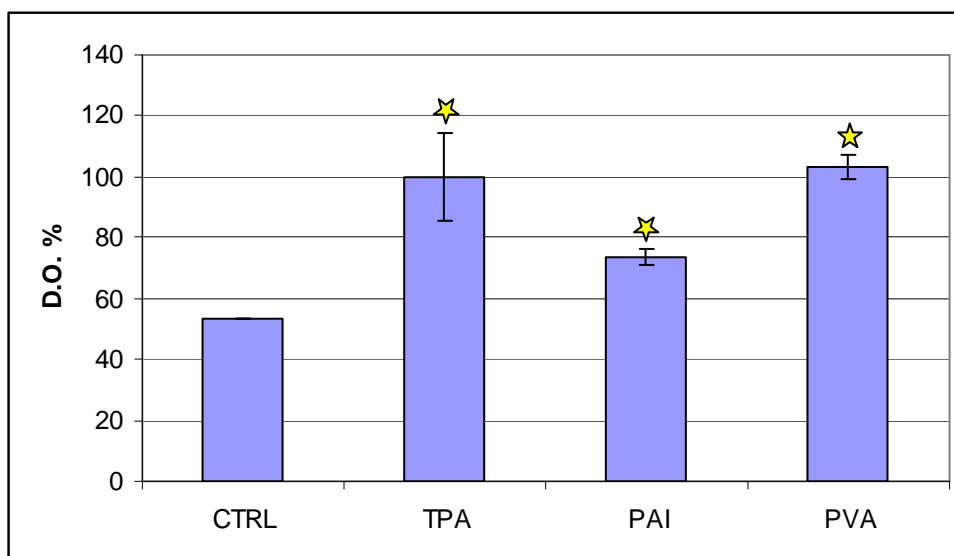


Fig. 4.26: NBT di cellule THP-1 incubate per 72 h in presenza di TPA, PAI e PVA. I valori sono stati normalizzati rispetto al TPA, che è stato considerato come 100%, e sono la media \pm dev. st. di tre esperimenti indipendenti effettuati in triplicato.

★ significatività rispetto al controllo negativo (CTRL) $p < 0,05$ %.

Lo stesso test eseguito sui macrofagi RAW 264.7 dopo 72 ore di incubazione con PAI e PVA e con i polimeri di confronto a base di poliacrilammide (PAA) e di acido ialuronico di origine biotecnologia, ha dimostrato che entrambi gli hydrogels non

influenzano il differenziamento macrofagico, si osservano infatti valori di assorbanza inferiori o paragonabili al controllo negativo sia per le cellule rimaste adese al pozzetto di coltura che per quelle rimaste in sospensione. Soltanto l'acido ialuronico sembra stimolare in modo significativo i macrofagi RAW rimasti in sospensione, raggiungendo un valore di assorbanza paragonabile a quello del controllo positivo che in questo esperimento è rappresentato dal lipopolisaccaride batterico (LPS). Probabilmente l'azione dell'acido ialuronico è dovuta alla facile degradabilità di questo polimero di origine naturale.

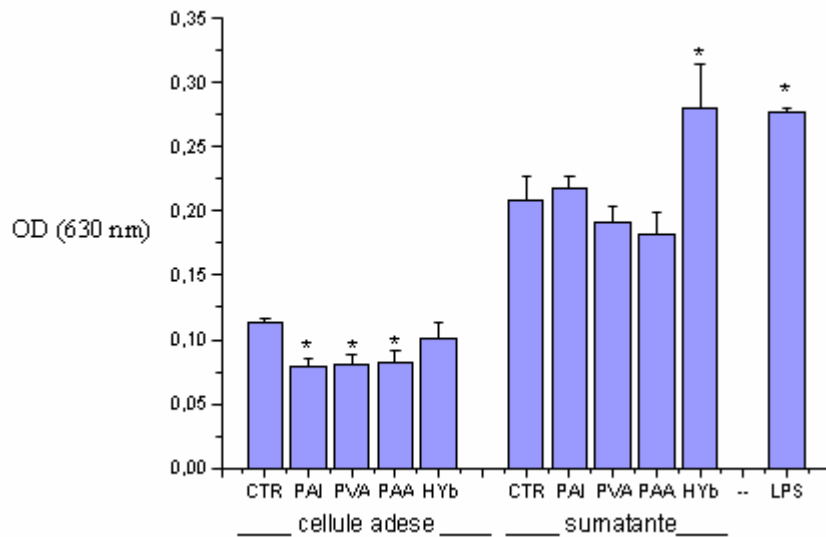


Fig. 4.27: test NBT effettuato sui macrofagi RAW 264.7 cresciuti in presenza dei polimeri PAI e PVA dopo 72 h di incubazione. Per confronto sono stati utilizzati polimeri a base di poliacrilammide (PAA) ed acido ialuronico di origine biotecnologica (HYb) ed il controllo positivo lipopolisaccaride (LPS). I valori di assorbanza sono la media \pm dev. st. di tre esperimenti indipendenti effettuati in triplicato. Analisi statistica: * $p < 0.05$ rispetto al controllo (CTR).

Test di endocitosi in fase fluida

Il meccanismo di endocitosi è stato valutato nelle cellule U937 e THP-1 dopo 48 e 72 ore di trattamento con PAI e PVA e dopo 1 e 2 ore di incubazione con il colorante fluorescente Lucifer Yellow. Per entrambe le linee cellulari si è osservato che la percentuale di cellule endocitiche dopo incubazione con i polimeri è simile a al controllo negativo, sia a due che a tre giorni; ciò dimostra che la presenza degli

hydrogels non influisce sulla capacità di endocitosi delle THP-1 e U937. Il test ha comunque messo in evidenza che il numero di cellule che endocitano dopo 48 ore di incubazione con i polimeri è, per entrambe le linee, più alto nella seconda ora di incubazione con il colorante. Questo *trend* si inverte alle 72 ore, dove osserviamo una percentuale di cellule maggiore che endocita entro la prima ora. Ciò indica che entrambe le linee, lasciate a differenziare per due giorni, necessitano di più tempo per endocitare rispetto alle stesse incubate per tre. Un'altra osservazione generale è che la percentuale di cellule THP-1 che endocitano dopo i relativi trattamenti è maggiore (circa il doppio) rispetto alla stessa percentuale di U937; ciò ancora una volta è da attribuirsi al differente stadio differenziativo in cui si trovano le due linee monocitarie.

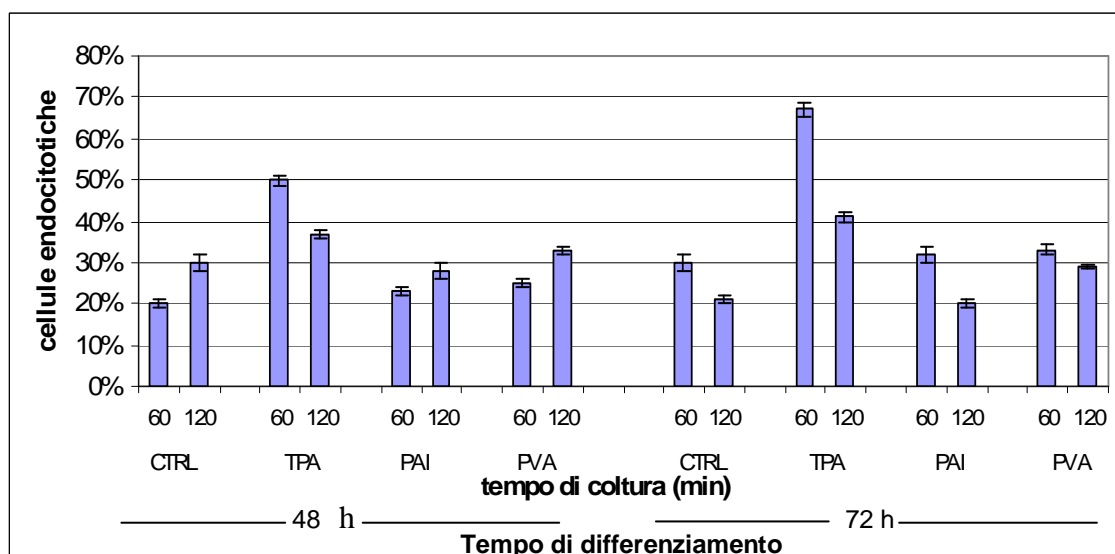
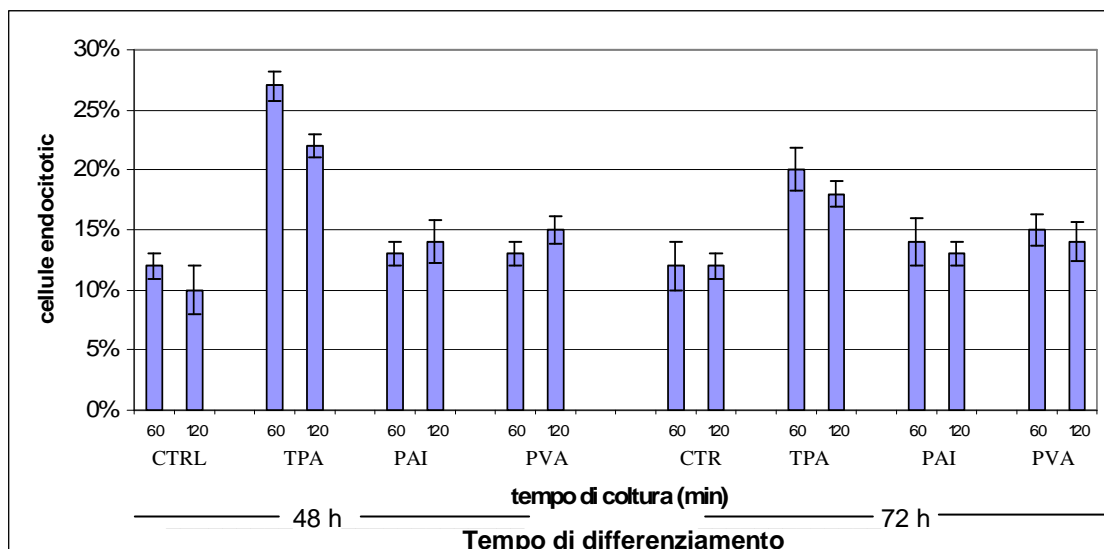


Fig. 4.28: percentuale di cellule U937 (in alto) e THP-1 (in basso) in adesione che, dopo 48 e 72 h di differenziamento con TPA e biopolimeri PAI e PVA, hanno internalizzato il Lucifer yellow dopo 60 e 120 min di incubazione con il colorante fluorescente.

I particolari delle cellule che endocitano sono mostrati in figura 4.29 e 4.30.

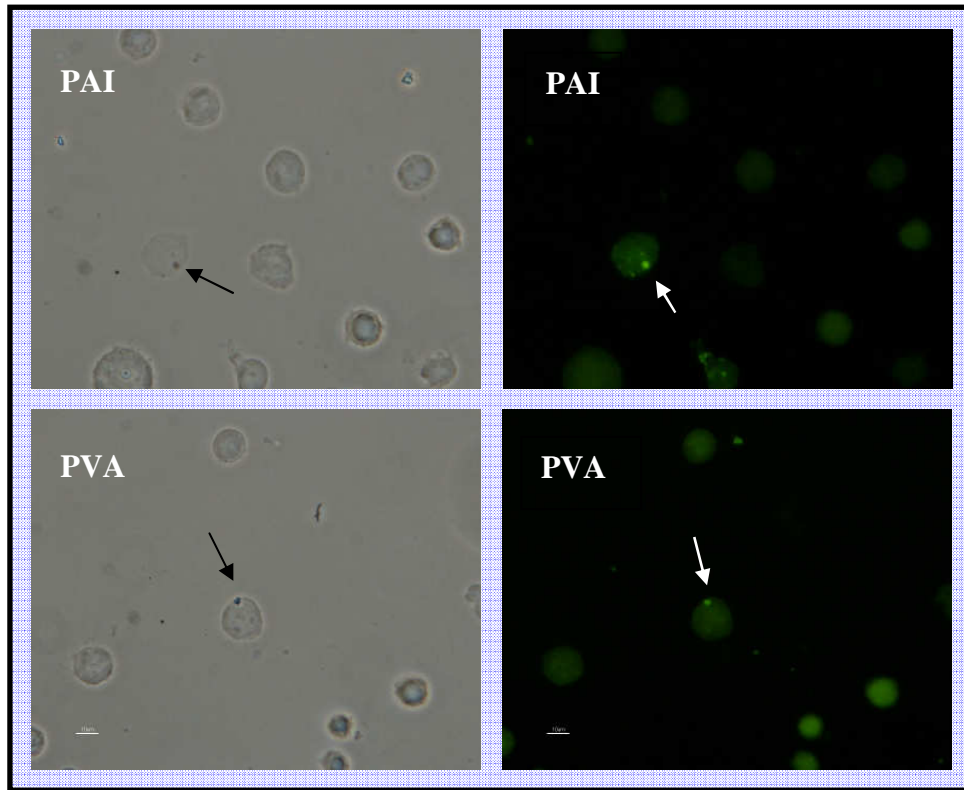


Fig. 4.29: immagini al microscopio a contrasto di fase e a fluorescenza di cellule U937 che hanno internalizzato il lucifer yellow dopo 72 h di trattamento con PAI e PVA, essendo state incubate per 60 min con il colorante fluorescente. Le frecce indicano le vescicole di endocitosi. Ingrandimenti originali 40 X.

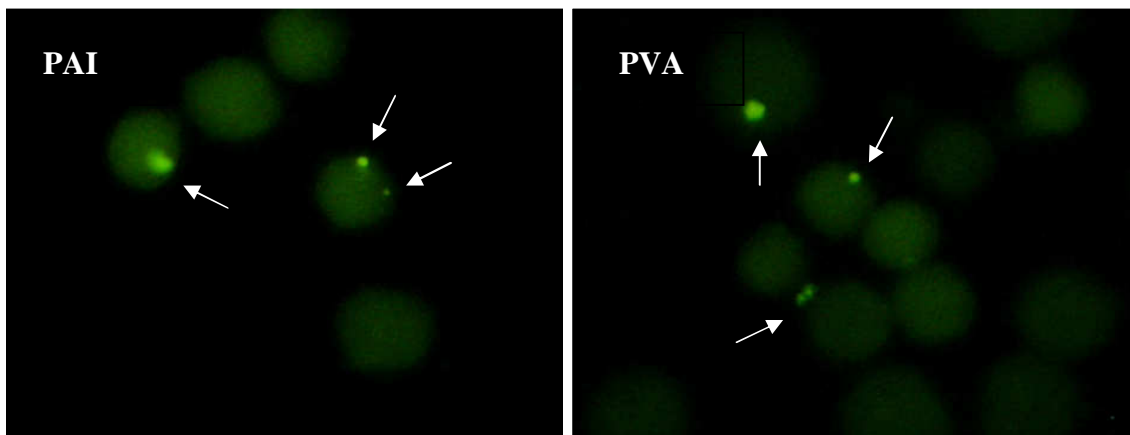


Fig. 4.30 immagini al microscopio a fluorescenza di cellule THP-1 che hanno internalizzato il lucifer yellow dopo 72 h di incubazione con PAI e PVA, essendo state in coltura per 60 min con il colorante fluorescente. Le frecce indicano le vescicole di endocitosi. Ingrandimenti originali 40 X.

Test di fagocitosi con particelle di latex

L'attivazione delle cellule THP-1 da parte degli hydrogels PAI e PVA è stata ulteriormente analizzata mediante il test di fagocitosi delle particelle di latex. Al microscopio interferenziale, queste appaiono come piccole sfere di colore celeste brillante; quando invece vengono fagocitate all'interno della cellula, si presentano come dei rigonfiamenti al di sotto della membrana citoplasmatica.

Le particelle, inoltre, prima della fagocitosi, possono essere captate dalle cellule, rimanendo adese alla superficie cellulare, ed in un secondo momento internalizzate.

L'esperimento è stato eseguito dopo 48 e 72 ore di incubazione, lasciando le particelle di latex a contatto con le cellule per 2, 4 e 6 ore.

Dopo 48 ore in presenza di PVA (fig. 4.31) le cellule mostrano una morfologia caratterizzata da contorni irregolari e una discreta attività fagocitica, anche se minore rispetto al TPA. Il PAI, invece, non sembra attivare i monociti che in sua presenza hanno aspetto regolare e tondeggiante, molto simile a quello delle cellule che rappresentano il controllo negativo.

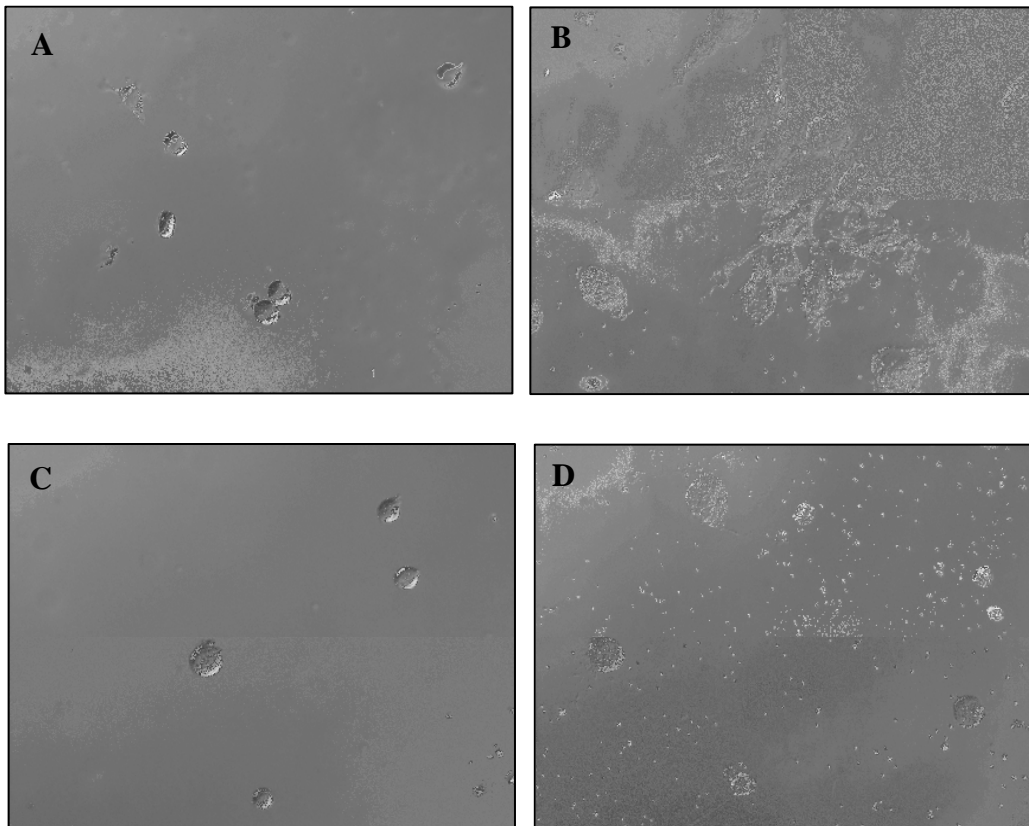


Fig. 4.31: micrografie al microscopio ottico interferenziale di cellule THP-1 dopo 48 h di differenziamento e 2 h di incubazione con particelle di latex: A) in assenza di agenti differenzianti, B) in presenza di TPA, C) in presenza di PAI, D) in presenza di PVA. Ingrandimenti originali 20 X.

Aumentando il tempo di incubazione con i polimeri a 72 ore e di contatto con le particelle di latex a 6 ore (fig. 4.32), osserviamo che nei trattati con PAI aumenta la quantità di particelle adese alla superficie cellulare (fig. 4.32 C) indicando che le cellule non sono così attive da fagocitare ma sono in grado di riconoscere e legare le piccole sfere di latex. Nei trattati con PVA, invece, si accentua la morfologia cellulare a “uovo fritto” e si osservano numerose particelle internalizzate (fig. 4.32 D). Sembra che sia soprattutto il PVA ad indurre il processo di fagocitosi aspecifica e ciò sicuramente è dovuto alla sua struttura che lo rende degradabile a differenza del PAI che invece è considerato un polimero non riassorbibile.

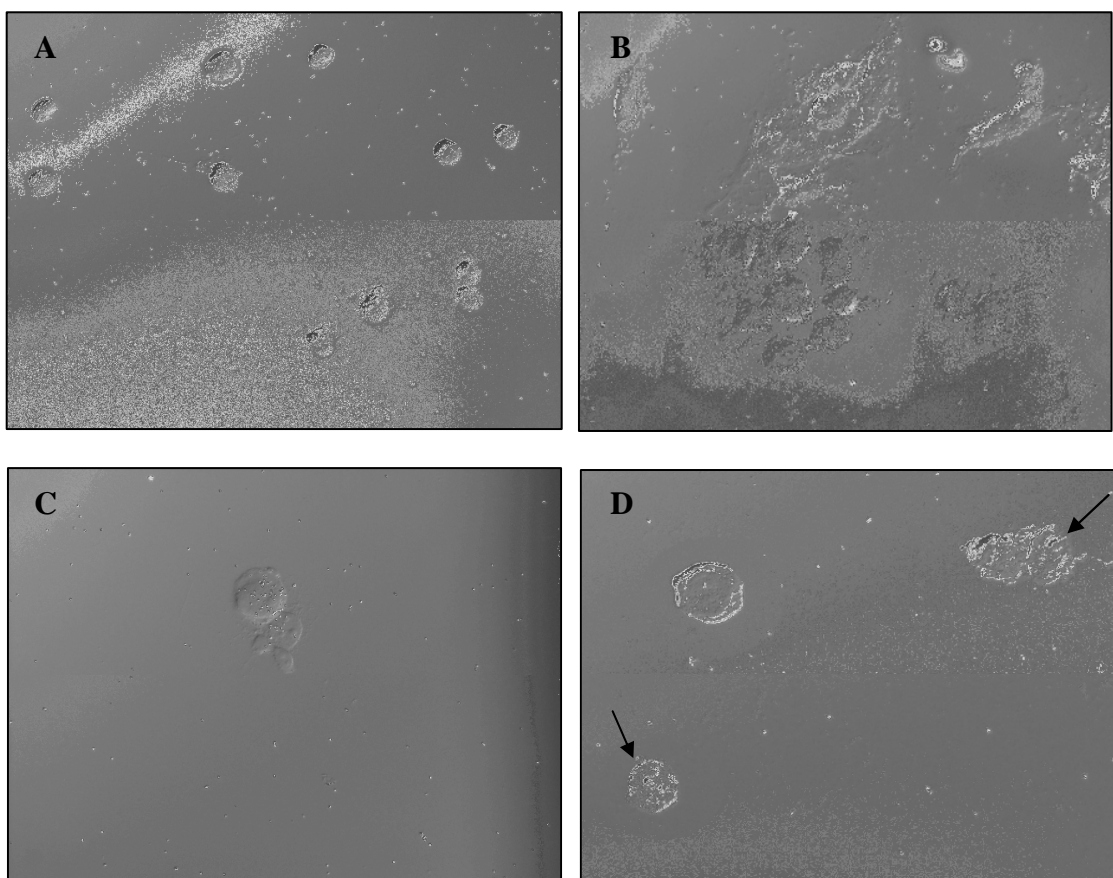


Fig. 4.32: micrografie al microscopio ottico interferenziale di cellule THP-1 dopo 72 h di differenziamento e 6 h di incubazione con particelle di latex: A) in assenza di agenti differenzianti, B) in presenza di TPA, C) in presenza di PAI, D) in presenza di PVA. Ingrandimenti originali 20 X.

Immunolocalizzazioni dei markers macrofagici

Il differenziamento della linee cellulari U937 e THP-1 è stato valutato a livello molecolare mediante lo studio della localizzazione di differenti markers macrofagici, dopo 48 e 72 ore di incubazione con i biopolimeri PAI e PVA. I markers analizzati sono antigeni di superficie, tranne nel caso del CD68 che invece è intracitoplasmatico.

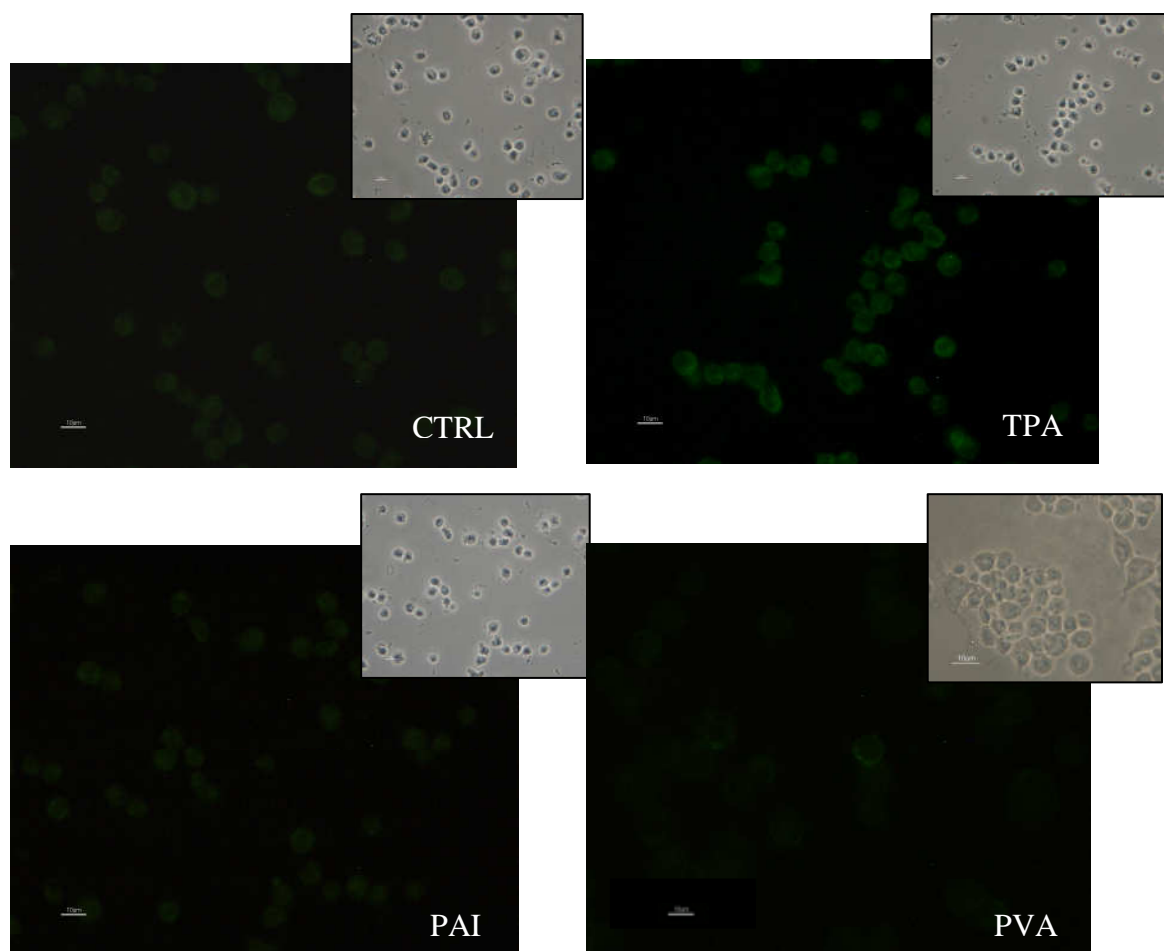


Fig. 4.33: immagini al microscopio a fluorescenza di cellule U937 marcate con anticorpo anti-CD14 dopo 48 h di incubazione con TPA (50 ng/ml) e con i polimeri PAI e PVA (50 mg/ml). Ingrandimenti originali 20X.

Come si può osservare nelle figure 4.33, 4.34, 4.35, 4.36 relative, rispettivamente, ai markers CD14, CD36, CD31 e CD68 i biopolimeri non influenzano l'espressione e la distribuzione di tali markers nelle cellule U937 poiché nè a 48 nè a 72 ore (dati non mostrati) si osservano differenze rilevanti rispetto al controllo negativo.

L'antigene CD14 (fig. 4.33) è debolmente espresso nel CTRL negativo, così come nei trattati con i polimeri; il trattamento con l'estere del forbolo TPA induce un aumento dell'espressione di questo antigene, osserviamo infatti una marcatura più intensa con zone di accumulo dell'antigene.

La marcatura con anticorpo anti-CD36 (fig. 4.34) risulta negativa, tranne che nelle cellule indotte a differenziare con TPA, in cui si osserva una distribuzione ad anello dell'antigene lungo il perimetro cellulare.

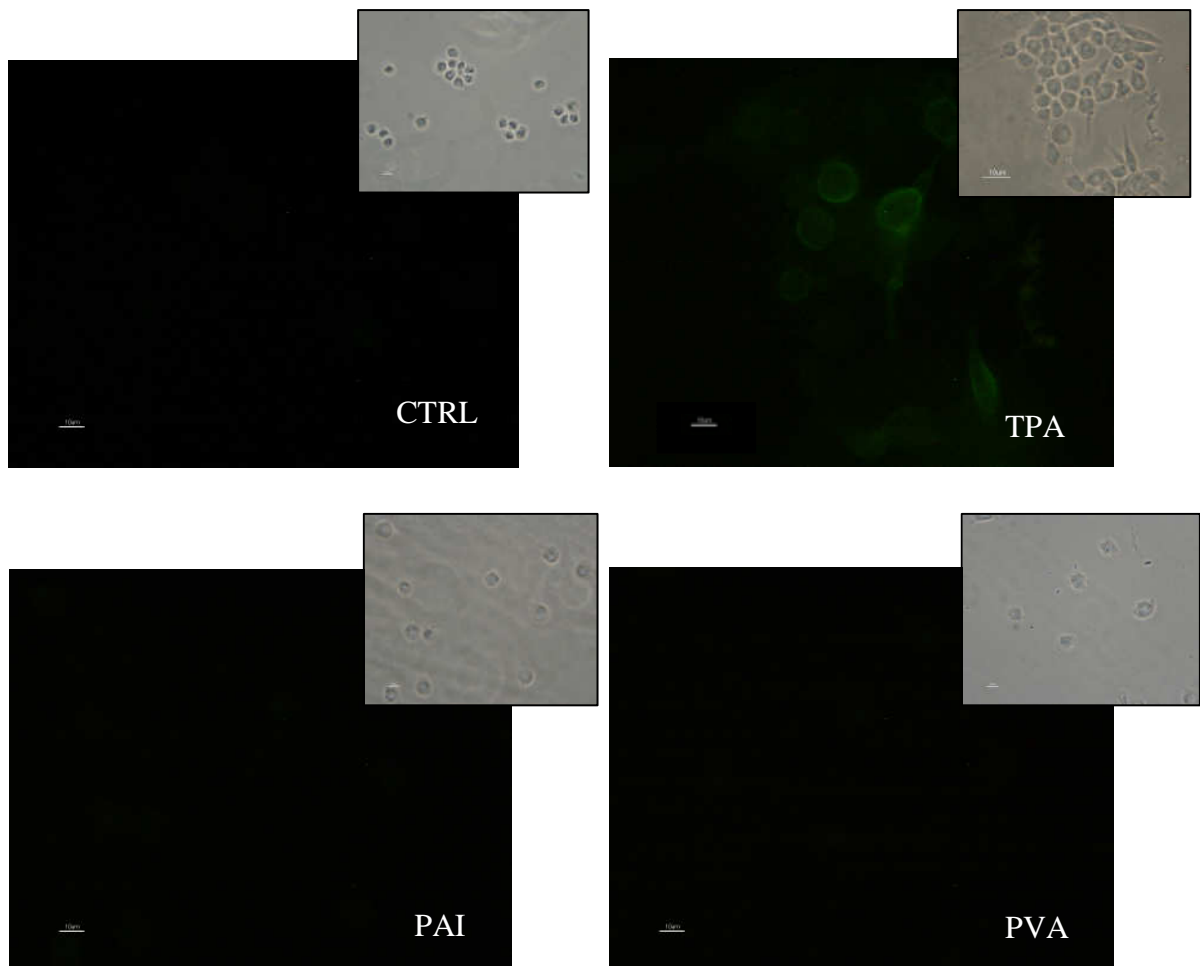


Fig. 4.34: immagini al microscopio a fluorescenza di cellule U937 marcate con anticorpo anti-**CD36** dopo 48 h di incubazione con TPA (50 ng/ml) e con i polimeri PAI e PVA (50 mg/ml). Ingrandimenti originali 20X.

Il marker CD31 (fig. 4.35) è debolmente espresso nel CTRL negativo e nei trattati con i polimeri, dove si osserva una lieve marcatura ad anello; anche in questo caso si osserva l'induzione dell'antigene da parte del TPA.

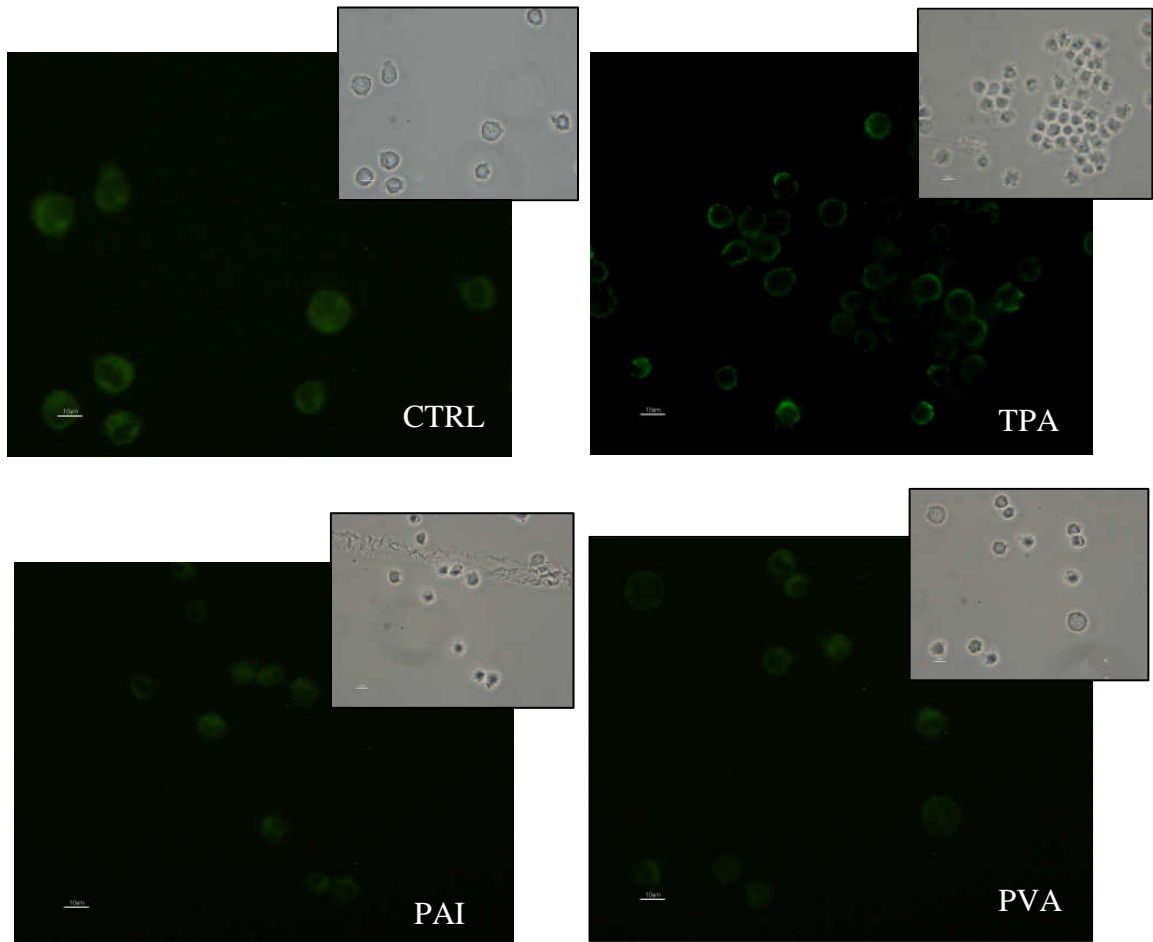


Fig. 4.35: immagini al microscopio a fluorescenza di cellule U937 marcate con anticorpo anti-**CD31** dopo 48 h di incubazione con TPA (50 ng/ml) e con i polimeri PAI e PVA (50 mg/ml). Ingrandimenti originali 20X.

La marcatura con CD68 (fig. 4.36) è negativa tranne che nelle cellule trattate con TPA. Probabilmente, come si evince dai dati riportati in letteratura, i promonociti U937 rappresentano uno stadio troppo precoce del differenziamento macrofagico per poter esprimere markers differenziativi; soltanto l'induzione con TPA, potente agente differenziante, riesce a stimolare queste cellule anche se in modo lieve.

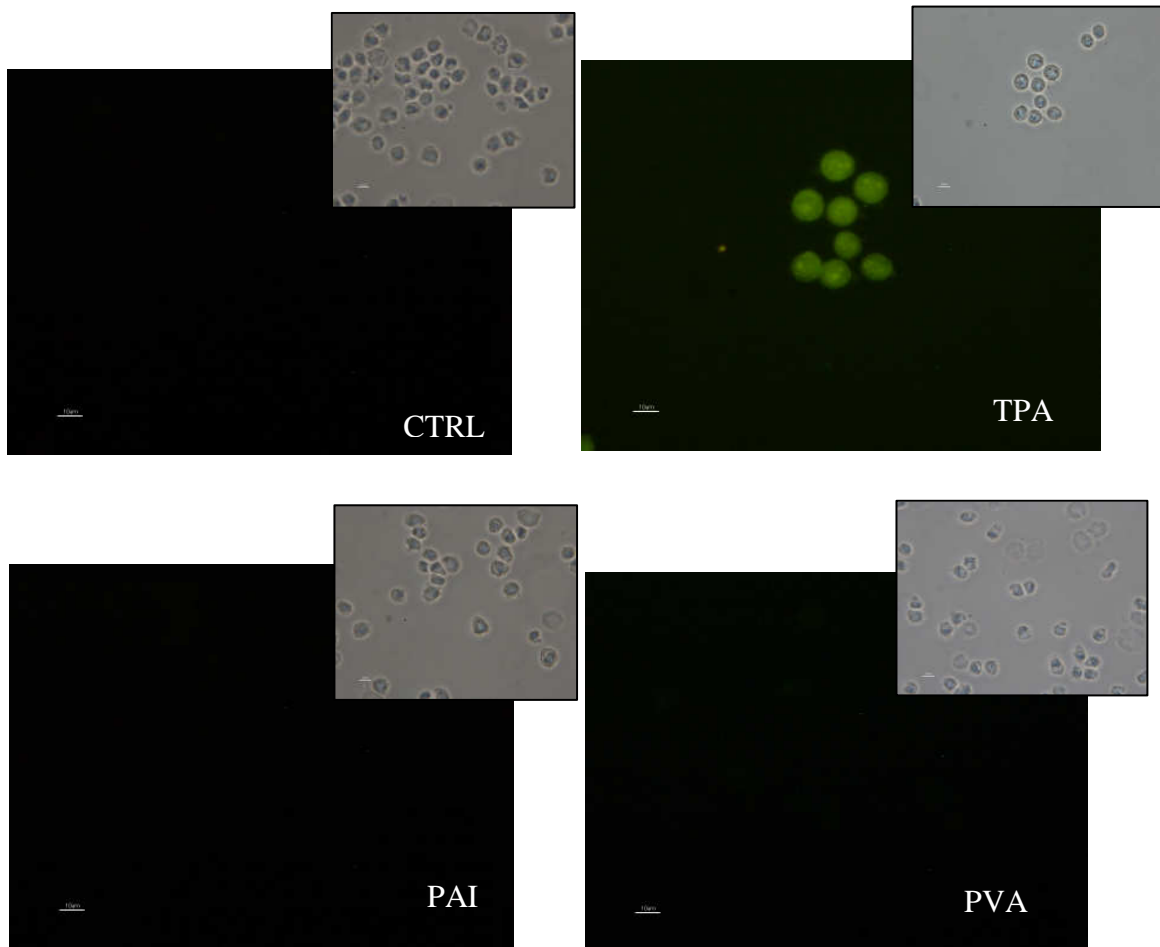


Fig. 4.36: immagini al microscopio a fluorescenza di cellule U937 marcate con anticorpo anti-CD68 dopo 48 h di incubazione con TPA (50 ng/ml) e con i polimeri PAI e PVA (50 mg/ml). Ingrandimenti originali 20X.

Diversamente da quanto osservato nelle U937, le THP-1 trattate con PAI e PVA, sia a 48 che a 72 ore, mostrano un *pattern* di fluorescenza paragonabile a quello del controllo positivo, sia come intensità che come localizzazione degli antigeni; è dunque possibile affermare che entrambi gli hydrogels influenzano positivamente il differenziamento delle THP-1.

Come possiamo osservare in fig. 4.37, l'antigene CD14, lievemente espresso nel controllo negativo, è ben evidente nei trattati con i polimeri, che presentano una fluorescenza ad anello molto netta con alcuni punti di polarizzazione, del tutto simile a quella che si osserva nel controllo positivo TPA.

Anche il CD 36 (fig. 4.38) si distribuisce, in modo evidente rispetto al controllo negativo, sul perimetro cellulare dei campioni trattati con PAI e PVA, ma la

marcatura appare comunque meno definita ed intensa rispetto al controllo positivo TPA.

Le cellule THP-1 marcate con anticorpo anti-CD31 (fig. 4.39) presentano un *pattern* di fluorescenza con caratteristiche che accomunano i campioni PVA e TPA, mentre la marcatura, seppur sempre ad anello, appare più intensa e definita nel campione PAI.

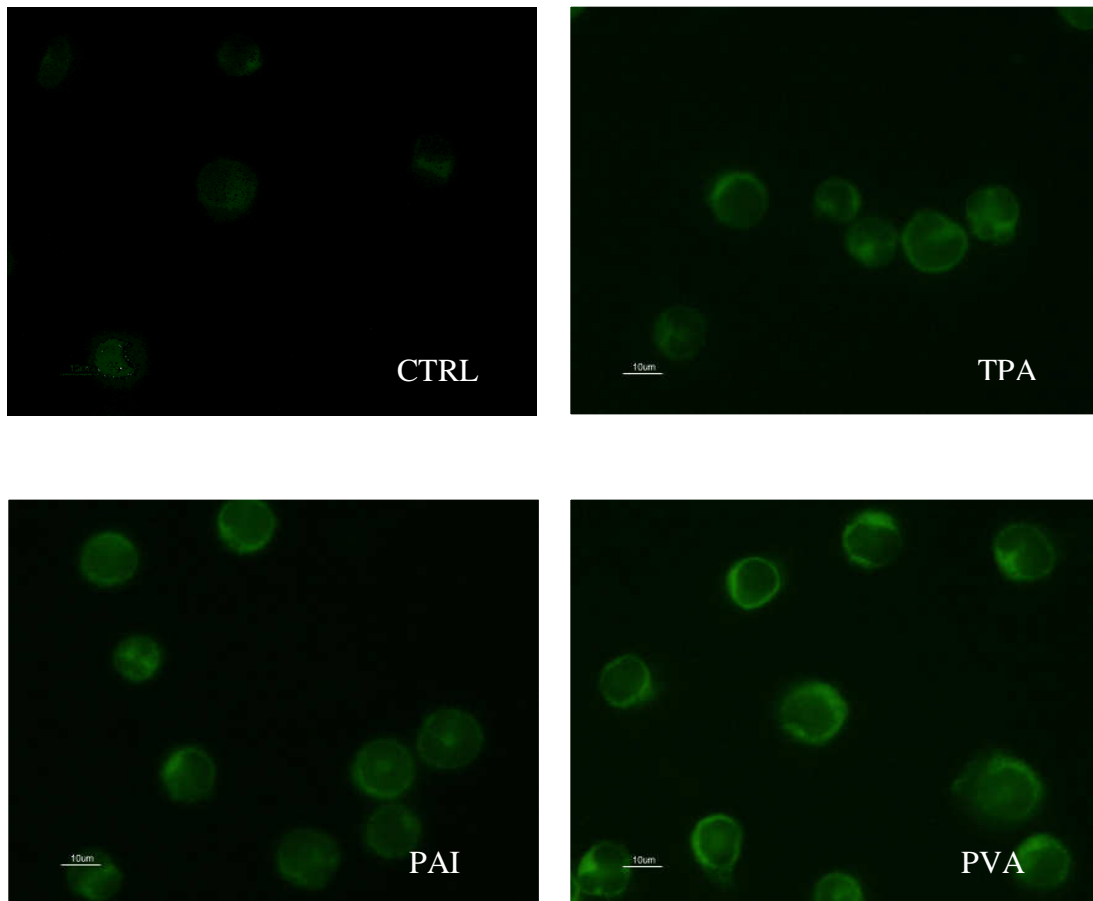


Fig. 4.37: micrografie al microscopio a fluorescenza di cellule THP-1 marcate con anticorpo anti-**CD14** FITC-coniugato, dopo essere state per 48 h in coltura in assenza di trattamenti CTRL, in presenza di TPA, di PAI e PVA. Ingrandimenti 60X.

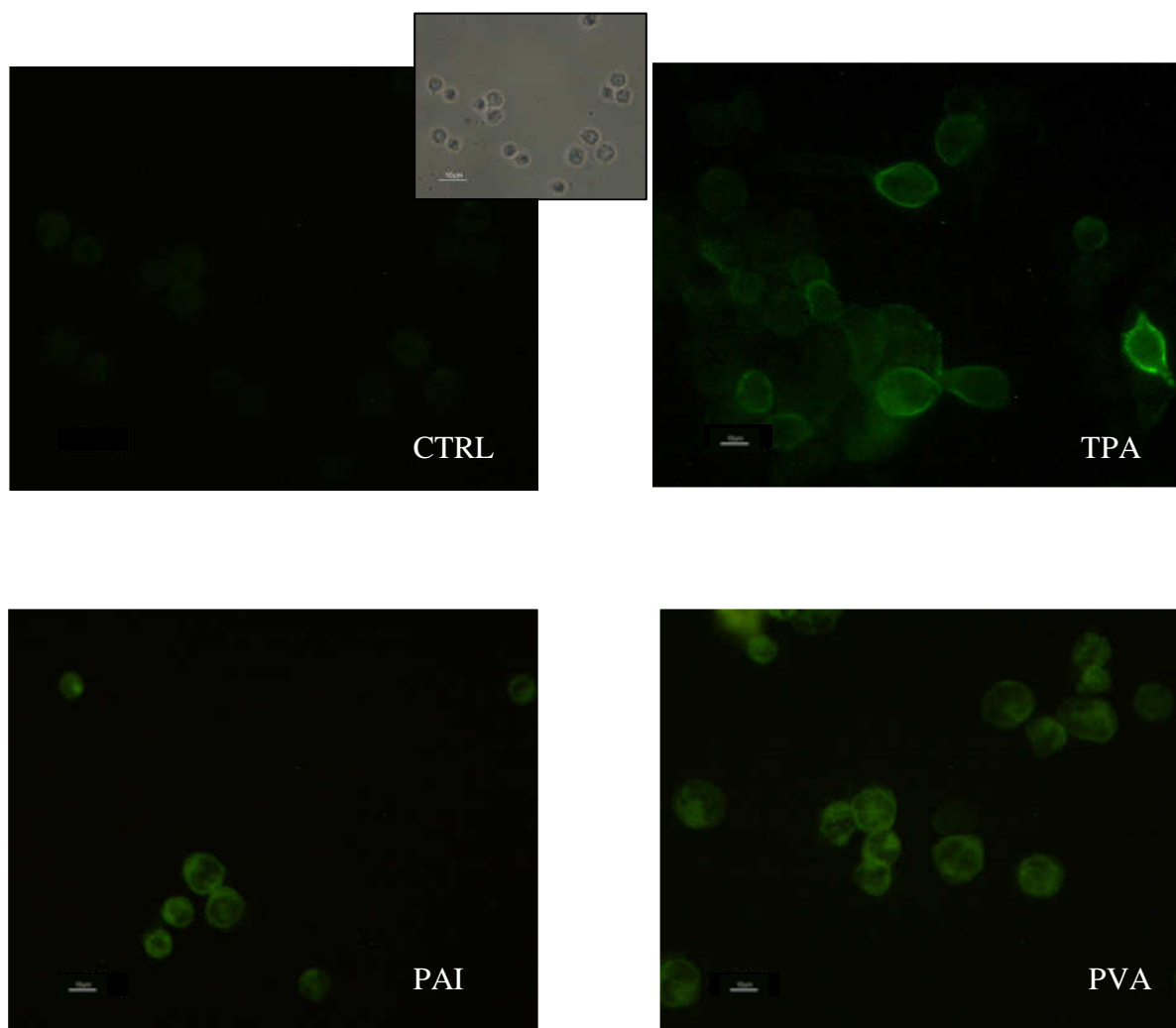


Fig. 4.38: immagini al microscopio a fluorescenza di cellule THP-1 marcate con anticorpo primario anti-CD 36 e secondario FITC-coniugato, dopo essere state per 48 h in coltura in assenza di trattamenti CTRL, in presenza di TPA, di PAI e PVA. Ingrandimenti 40X.

Infine, la fluorescenza relativa al CD68 (fig. 4.40) si distribuisce sottoforma di *spot* corrispondenti a granuli intracitoplasmatici all'interno delle THP-1 differenziate con TPA; i trattati con i polimeri esprimono questo marker in modo intenso nel citoplasma, ma la diversa morfologia cellulare fa sì che la fluorescenza sia concentrata tutta in una piccola area piuttosto che ben distribuita nel corpo cellulare come nelle cellule che in seguito a trattamento con TPA appaiono ben allungate.

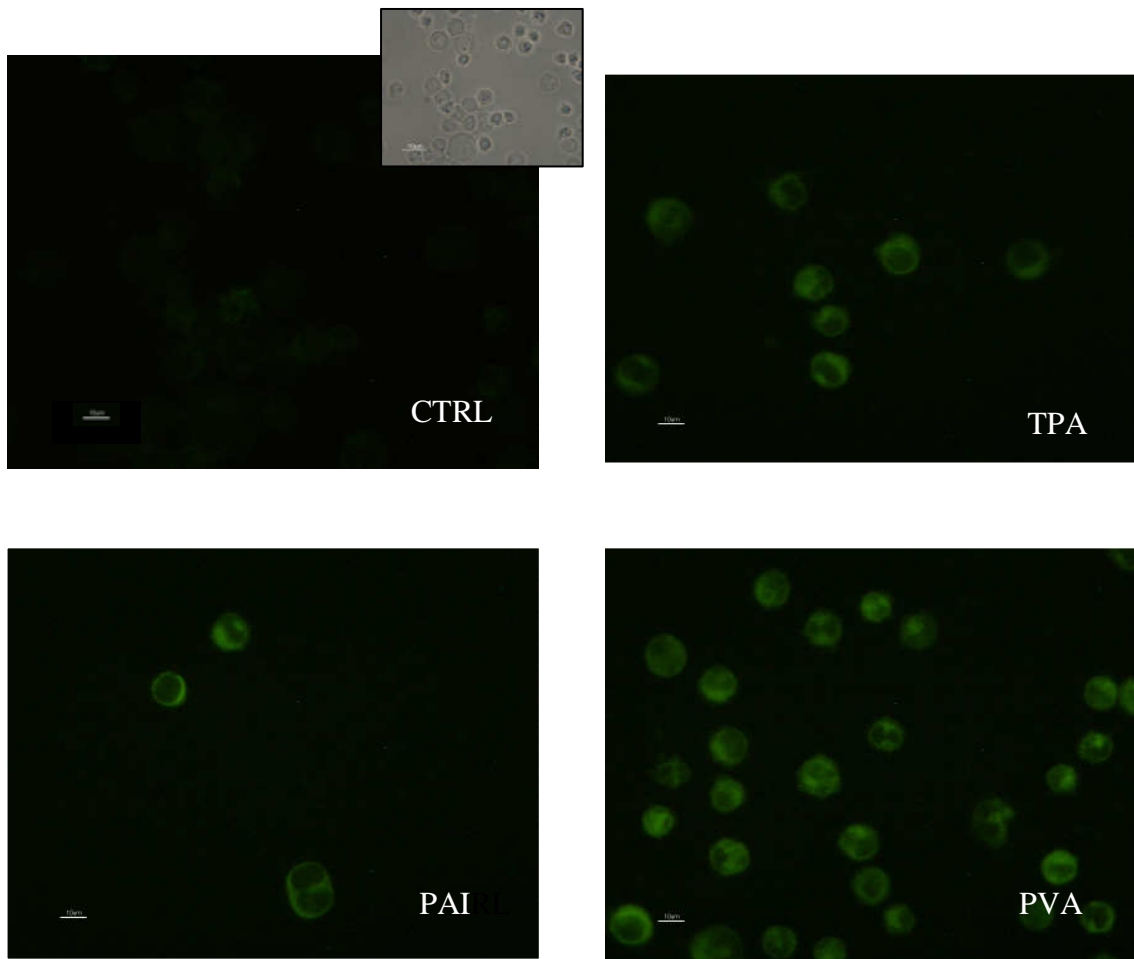


Fig. 4.39: Immagini al microscopio a fluorescenza di cellule THP-1 marcate con anticorpo primario anti-CD 31 e secondario FITC-coniugato, dopo essere state per 48 h in coltura in assenza di trattamenti CTRL, in presenza di TPA, di PAI e PVA. Ingrandimenti 40X.

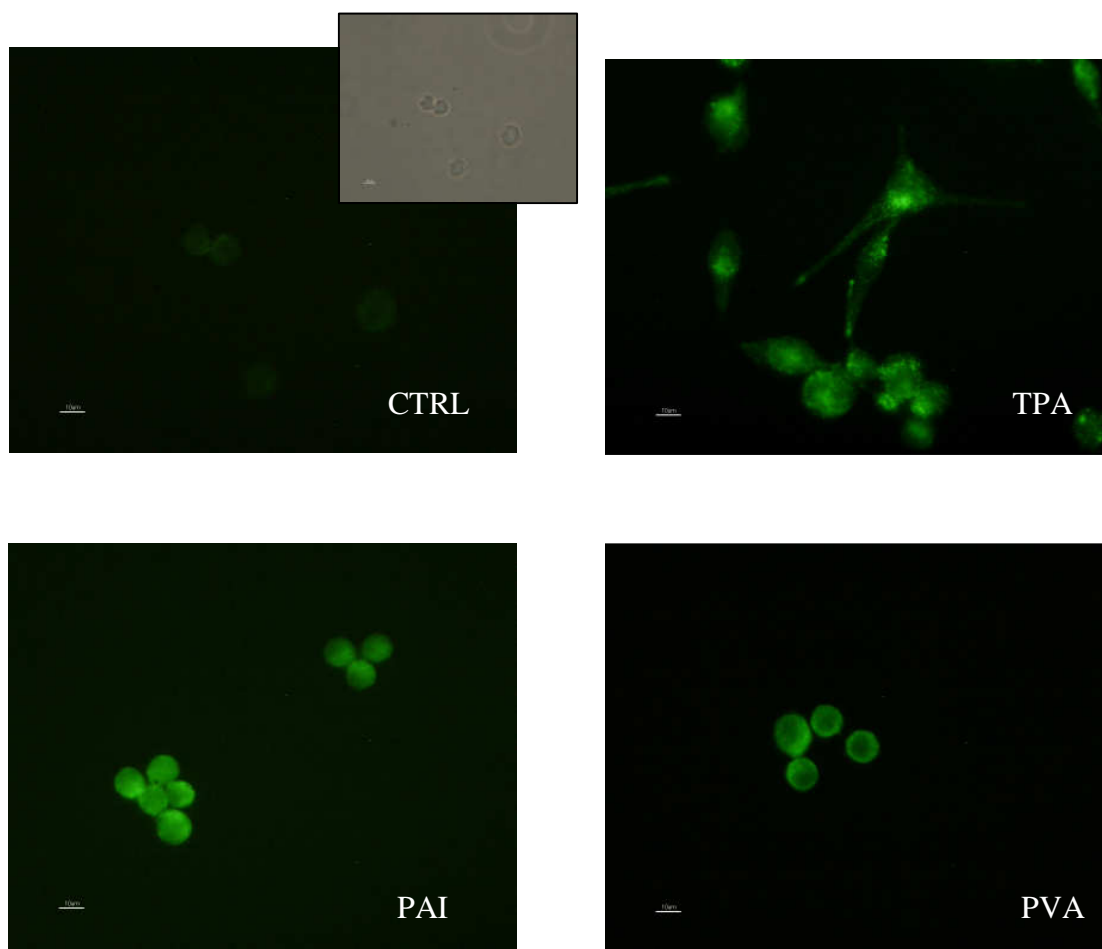


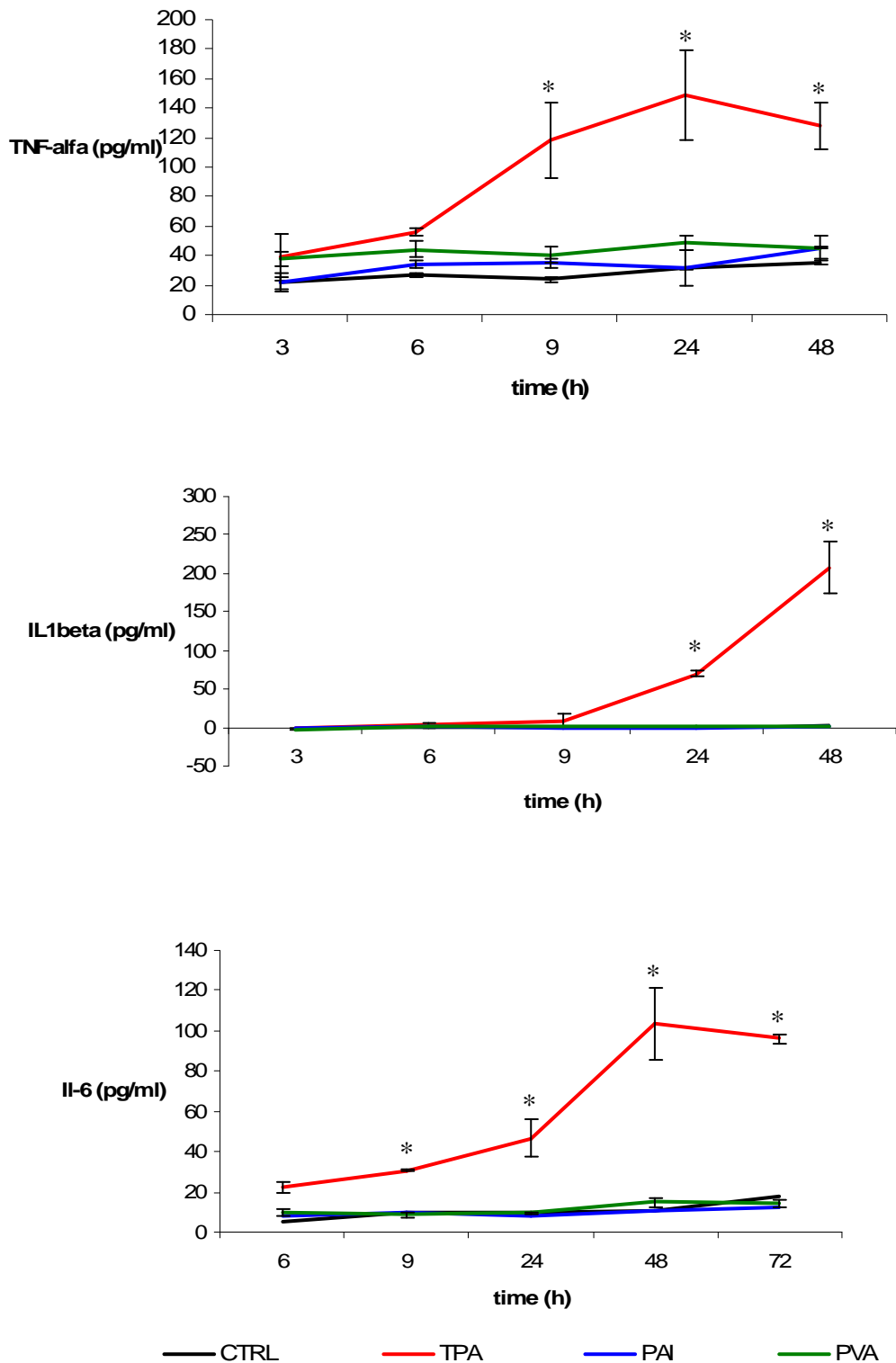
Fig. 4.40: immagini al microscopio a fluorescenza di cellule THP-1 marcate con anticorpo primario anti-CD 68 e secondario FITC-coniugato, dopo essere state per 48 h in coltura in assenza di trattamenti CTRL, in presenza di TPA, di PAI e PVA. Ingrandimenti 40X.

Rilascio di citochine pro-infiammatorie (Test ELISA)

Il rilascio di citochine proinfiammatorie in seguito al contatto con i biomateriali è un importante indice di attivazione macrofagica. Abbiamo valutato mediante Test ELISA la concentrazione delle citochine TNF- α , IL1- β e IL-6 nel surnatante di cellule THP-1 e U937 incubate per vari tempi con gli hydrogels PAI e PVA.

I grafici riportati in fig. 4.41 evidenziano che PAI e PVA sono immunocompatibili per la linea cellulare THP-1 poiché non stimolano la produzione di queste citochine, al contrario dell'agente differenziante TPA che ne induce il rilascio con andamento differenziale nel tempo. Il TNF- α viene rilasciato a bassissimi livelli nelle cellule trattate con PVA, ma tuttavia in maniera paragonabile al controllo negativo; sembra infatti che piccolissime dosi (circa 30 pg/ml) di questa citochina vengano rilasciate in maniera costitutiva dalle cellule THP-1.

Fig. 4.41: test ELISA per misurare il rilascio di citochine pro-infiammatorie nei surnatanti di cellule



THP-1 incubate per diversi tempi (da 3 a 72h) con i polimeri PAI e PVA (50 mg/ml) e con TPA (50 ng/ml). I valori sono espressi come media \pm dev.st. di tre esperimenti indipendenti effettuati in triplicato. Analisi statistica rispetto al controllo negativo: * $p < 0,05$.

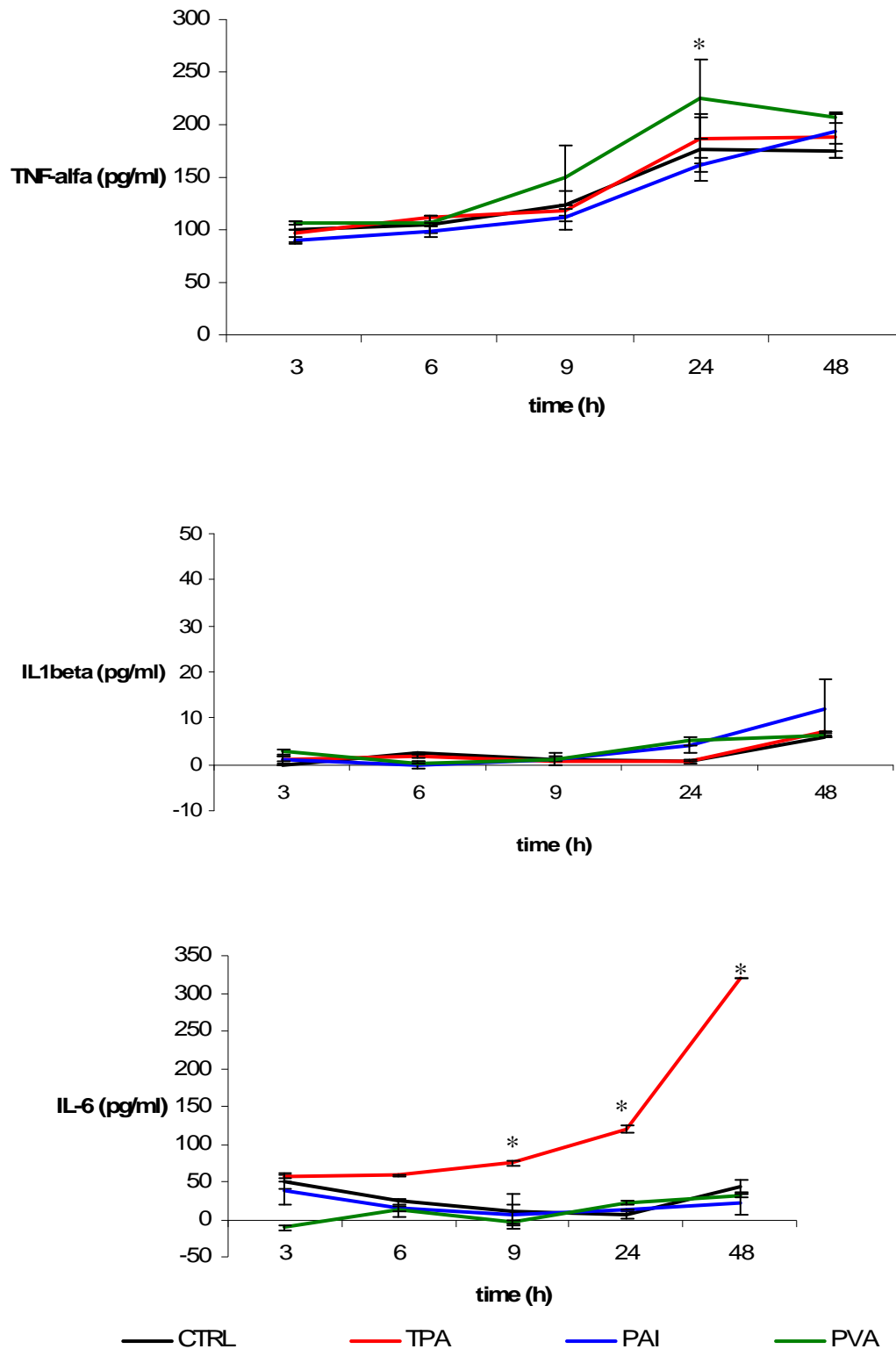


Fig. 4.42: test ELISA per misurare il rilascio di citochine pro-infiammatorie nei surnatanti di cellule U937 incubate per diversi tempi (da 3 a 48 h) con i polimeri PAI e PVA (50 mg/ml) e con TPA (50 ng/ml). I valori sono espressi come media \pm dev.st. di tre esperimenti indipendenti effettuati in triplicato. Analisi statistica rispetto al controllo negativo: * $p < 0,05$.

I grafici riportati in figura 4.42 ci mostrano come i polimeri PAI e PVA siano immunocompatibili anche per la linea cellulare U937. Il trattamento con entrambi gli hydrogels non induce il rilascio di IL1- β e di IL-6. IL TNF- α viene prodotto costitutivamente dalle cellule di controllo con un lieve aumento nel tempo, dovuto probabilmente al fatto che le cellule proliferano aumentando di numero; una lieve induzione, evidente soprattutto alle 24 ore, sembra essere stimolata dal PVA, probabilmente dovuta alla biodegradabilità di questo biomateriale. Del resto l'analisi del rilascio di ossido nitrico, effettuata sulle RAW 264.7 (fig. 4.43), ha evidenziato che queste cellule, dopo trattamento di 48 ore con PVA, rilasciano considerevoli quantità di questo mediatore dell'inflammazione.

Come spesso riportato in letteratura, le U937 sono in uno stadio molto precoce del differenziamento macrofagico; ciò risulta evidente dai grafici di fig. 4.42 in cui si osserva che neanche il TPA riesce ad attivarle completamente, dal momento che anche in sua presenza non riescono a rilasciare quantità di TNF- α e IL1- β che siano significativamente più elevate rispetto al controllo negativo.

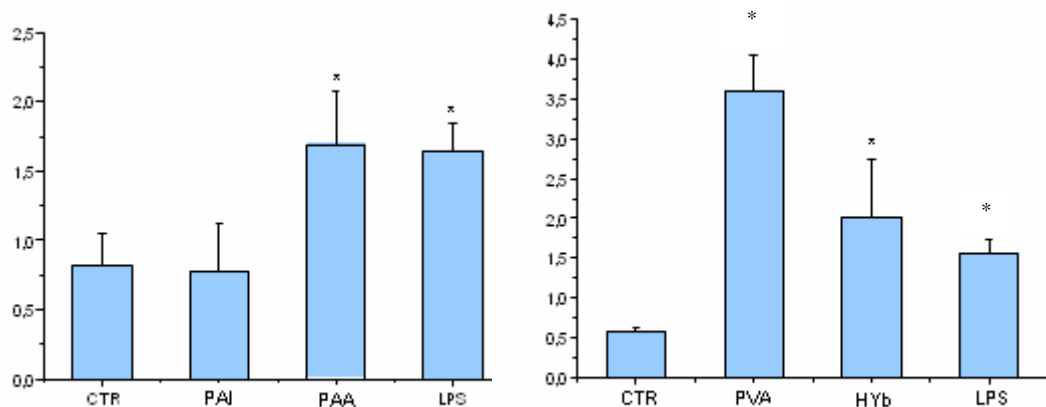


Fig.4.43: produzione di NO da parte di macrofagi RAW 264.7 cresciuti in presenza dei polimeri PAI e PVA dopo 48 di incubazione. Per confronto sono stati utilizzati polimeri PAA, HYb e come controllo positivo l'LPS. Analisi statistica: * $p < 0.05$ rispetto al controllo (CTR).

Poliuretano

L'attivazione dei pro-monociti U937 e dei monociti THP-1 è stata valutata in via preliminare mediante test NBT. Il saggio, eseguito dopo 72 ore di incubazione con il poliuretano e in presenza del controllo positivo TPA, ha rivelato che il PU non ha effetto differenziante su queste due linee cellulari, infatti per entrambe si osservano valori di assorbanza percentuali paragonabili a quelli dei rispettivi controlli negativi (fig. 4.44 A e B).

Anche dal punto di vista morfologico il PU non sembrava indurre modificazioni nelle linee cellulari analizzate, dal momento che le THP-1 e U937, pur aderendo ad esso, conservavano una forma rotondeggiante, mentre per le RAW 264.7 non si osservava la fusione in cellule giganti. La scarsa attivazione del PU nei confronti dei nostri modelli sperimentali trova una spiegazione nella struttura di questo materiale che non è degradabile.

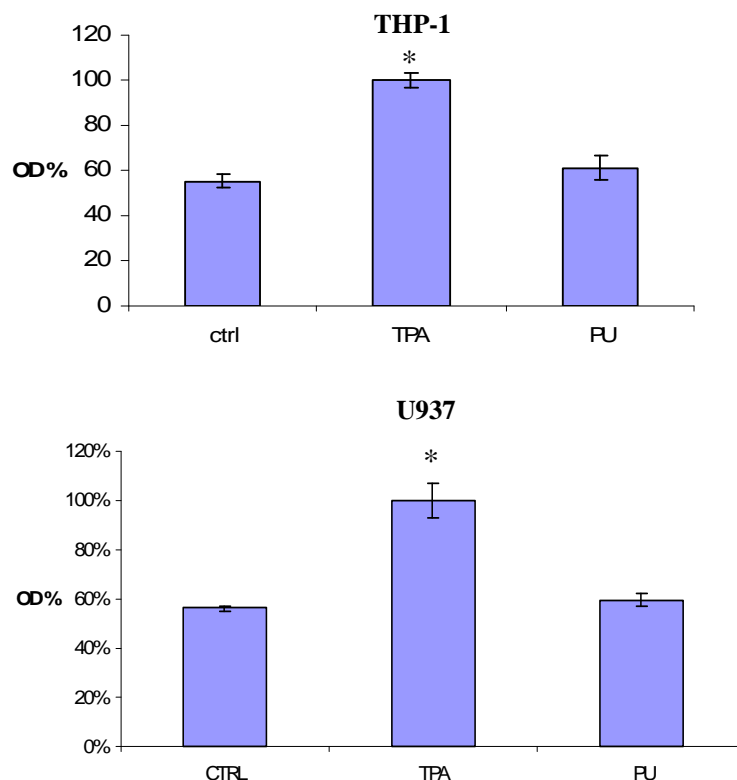


Fig 4.44: NBT di cellule THP-1 e U937 incubate per 72 h con PU (diametro circa 1 cm). I valori sono stati normalizzati rispetto al TPA che è stato considerato come 100% e sono la media \pm dev.st. di tre esperimenti indipendenti effettuati in triplicato. Significatività rispetto al CTRL: * $p < 0,05$.

5. DISCUSSIONE DEI RISULTATI E CONCLUSIONI

Negli ultimi 30 anni la ricerca nel settore dei “biomateriali” ha mostrato una costante crescita, consentendo lo sviluppo di nuove applicazioni che hanno determinato il miglioramento della qualità di vita di milioni di persone. I biomateriali, infatti, hanno risposto al bisogno dell’uomo di sostituire o integrare tessuti ed organi non più attivi dal punto di vista funzionale o metabolico, danneggiati da eventi traumatici o patologici.

Tuttora, l’obiettivo dei ricercatori è quello di conoscere in maniera sempre più approfondita i meccanismi coinvolti nell’interazione tessuto-biomateriale in modo da progettare molecole, sostanze e prototipi di dispositivi medici con caratteristiche chimico-fisiche che ne garantiscano una elevata biocompatibilità.

In questo contesto si inseriscono i “polimeri sintetici” i cui principali vantaggi, rispetto alle altre classi di materiali, sono proprio una maggiore biocompatibilità, la possibilità di modificarne ampiamente composizione e proprietà fisico-meccaniche, bassi coefficienti di attrito, facile processabilità e lavorabilità anche in forme e strutture complesse, possibilità di modificarne chimicamente e/o fisicamente la superficie, possibilità di immobilizzare cellule o biomolecole al loro interno.

Lo scopo di questo lavoro sperimentale è stato quello valutare *in vitro* la biocompatibilità di tre differenti polimeri sintetici, ossia polialchilimide (PAI) e polivinilalcol (PVA), che appartengono al gruppo degli *hydrogels*, e poliuretano (PU), che fa parte degli elastomeri. In virtù delle loro diverse proprietà strutturali, tali polimeri si distinguono per le loro diverse applicazioni cliniche, dal momento che PAI e PVA trovano impiego nella chirurgia estetica e ricostruttiva per l’aumento dei tessuti molli, mentre il poliuretano viene utilizzato nella realizzazione di dispositivi cardiovascolari.

Lo studio della biocompatibilità, intesa come la “capacità di un biomateriale di svolgere la funzione per la quale è stato progettato determinando una risposta appropriata nell’ospite” (Williams D.F., 1987), ci ha indirizzati verso la scelta di un particolare modello sperimentale rappresentato dai monociti/macrofagi, la popolazione cellulare che agisce in prima linea nella risposta infiammatoria che si

innesca come conseguenza all'impianto; proprio la durata e l'estensione di tale risposta determinano la biocompatibilità di un biomateriale.

In particolare le nostre indagini sono state condotte contemporaneamente su tre linee cellulari, U937 (promonociti), THP-1 (monociti) e RAW 264.7 (macrofagi), che rappresentano i tre stadi, uno successivo all'altro, del differenziamento monocitico/macrofagico.

Gli studi preliminari di citotossicità hanno dimostrato che entrambi gli *hydrogels* sono altamente biocompatibili. Il test MTT effettuato sulle RAW 264.7 dopo 24-48-72 h di incubazione con gli *hydrogels* ha rivelato una percentuale di vitalità paragonabile a quella del controllo negativo, come del resto è stato confermato dall'assenza di alterazioni morfologiche all'osservazione al microscopio ottico dopo colorazione con blu di toluidina. L'assenza di citotossicità dopo incubazione con PAI e PVA è stata riscontrata anche per le cellule U937 e THP-1, per le quali al test MTT è stato affiancato anche il Neutral Red per la valutazione dell'attività lisosomale; anche le immagini al microscopio ottico, con e senza colorazione con ematossilina/eosina, hanno escluso la presenza di alterazioni morfologiche; in pochi casi si è osservata morte cellulare per apoptosi, l'assenza di necrosi ha fatto escludere una reazione infiammatoria rilevante. In generale, si è osservato per tutte e tre le linee un leggero calo di vitalità dopo 48 e 72 ore, probabilmente dovuto al fatto che le cellule aumentano di numero, ma nello stesso tempo hanno a disposizione un'area limitata del pozzetto su cui aderire, essendo una buona parte di tale area occupata dal polimero; ciò ne determina il distacco e la morte; questo comportamento era stato precedentemente osservato nei fibroblasti 3T3 in presenza di polialchilimide (Ramires *et al.*, 2004). In generale, si è osservata una scarsa adesione cellulare agli *hydrogels*, in accordo con i dati presenti in letteratura che evidenziano come materiali altamente idrofilici non favoriscono l'adesione sulla loro superficie (Narita *et al.*, 2000). Al contrario, il poliuretano, grazie alla sua idrofobicità, promuove il processo di adesione cellulare, in dipendenza dal tipo di superficie analizzata e dalla particolare linea cellulare. Esso, infatti, possiede due superfici topograficamente diverse: quella liscia non presenta adesione cellulare ed è caratterizzata dalla presenza di strutture che al SEM appaiono simili a "crateri", e che finiscono per collassare su se stesse determinando la formazione di microcavità (diametro medio circa 18 μm) in cui si accumulano detriti; quella definita rugosa è caratterizzata dalla presenza di micropori con diametro medio di circa 180 μm e appare altamente

citocompatibile. Ad essa le cellule aderiscono con comportamenti significativamente diversi: le cellule U937 e THP-1 si concentrano maggiormente all'interno dei pori e conservano una morfologia tondeggiate, anche se si osserva l'emissione di pseudopodi con cui si agganciano al substrato; le cellule RAW 264.7 si distribuiscono perlopiù nelle aree che separano i pori e mostrano il fenotipo allungato tipico dello *spreading* cellulare. La capacità del PU di indurre l'adesione cellulare, dunque, è strettamente legata alla rugosità della sua superficie; molti dati presenti in letteratura confermano che l'aumento della rugosità della superficie di un biomateriale potenzia l'adesione cellulare (Chung T.W. *et al.* 2003; Lampin M. *et al.*, 1996). I saggi di citotossicità con MTT e le osservazioni al microscopio ottico dopo colorazione con ematossilina/eosina hanno confermato, come le osservazioni al SEM, che il PU è altamente biocompatibile dal momento che per tutte e tre le linee non si osserva una diminuzione della vitalità cellulare in sua presenza.

Gli ottimi risultati ottenuti con le analisi citotossicologiche ci hanno indirizzato verso lo studio del probabile differenziamento indotto dai biopolimeri sulle cellule con cui sono stati tenuti a contatto. Le osservazioni al microscopio ottico invertito rivelano come sia in presenza di PAI che di PVA le cellule U937 e THP-1 mostrino una maggiore tendenza a passare da una crescita in sospensione ad una crescita in adesione, sviluppando una morfologia diversa a seconda del tipo cellulare. Le U937 incubate con PAI mostrano contorni irregolari sia a 48 che a 72 ore, ma è soprattutto in presenza di PVA che si osserva la comparsa di cellule con morfologia allungata. Le THP-1 presentano l'emissione di pseudopodi e, dunque, una forma allungata sia in presenza di PAI che di PVA; si è osservato come la tendenza ad aderire sia maggiore in presenza di fibronectina, una proteina della matrice extracellulare che mima l'ambiente fisiologico; dunque l'azione sinergica della fibronectina e dei biopolimeri favorisce la transizione delle THP-1 dalla crescita in sospensione a quella in adesione. Del resto, Nuttelman C.R. *et al.*, (2001) hanno recentemente dimostrato come l'assorbimento della fibronectina, non solo nel pozzetto di coltura, ma bensì sulla superficie del PVA, favorisca la migrazione e l'attacco dei fibroblasti NIH3T3 su di essa.

Le analisi biochimiche (test NBT) hanno messo in luce un diverso comportamento dei due *hydrogels*, dal momento che pur inducendo entrambi un'attivazione in senso macrofagico, lo fanno a livelli diversi: il PAI ha un maggiore potere differenziante nelle U937, il PVA al contrario nelle THP-1 tanto da raggiungere un valore di

assorbanza, proporzionale alla percentuale di cellule differenziate, paragonabile a quello del controllo positivo (TPA). Al contrario, almeno da un punto di vista biochimico, i due *hydrogels* non sembrano indurre differenziamento nelle RAW 264.7 dal momento che si osservano valori di assorbanza paragonabili a quelli del controllo negativo. Probabilmente, questa linea cellulare, nei confronti della quale comunque PAI e PVA si mostrano perfettamente biocompatibili, non rappresenta un buon modello di studio per il differenziamento, dal momento che si tratta di macrofagi maturi, dunque già completamente differenziati e caratterizzati da una crescita in adesione.

Da un punto di vista biochimico neanche il Poliuretano sembra attivare le cellule RAW.264.7; ciò è stato confermato anche dalle osservazioni al SEM nelle quali non si osserva la fusione dei macrofagi murini adesi al biomateriale in FBGC (*foreign body giant cells*), la cui funzione è quella di degradare il corpo estraneo causando l'infiammazione cronica. La struttura del nostro PU, infatti, è tale da renderlo scarsamente degradabile e proprio per questo non influisce sul differenziamento macrofagico e pertanto non induce cambiamenti morfologici e/o funzionali neanche nelle cellule U937 e THP-1. Si può concludere che questo poliuretano risponde perfettamente alle aspettative di un materiale "biostabile" (Pinchuk L. *et al.*, 1994), che possa essere impiegato in impianti a lungo termine senza il rischio di una risposta infiammatoria che comporterebbe la rimozione dell'impianto. Il nostro PU rappresenta, inoltre, un materiale sicuro per la salute umana poiché non degradandosi non rilascia diamine aromatiche che sono tossiche e potenzialmente carcinogene per l'uomo (Batich C *et al.*, 1989; Szycher M., 1988).

L'analisi dei markers differenziativi ha evidenziato nuovamente la diversa influenza degli *hydrogels* nei confronti delle linee U937 e THP-1. Infatti, nelle U937 PAI e PVA non inducono variazioni nell'espressione e nella distribuzione di tali antigeni che oltretutto appaiono ben evidenti soltanto nelle cellule trattate con l'agente differenziante TPA. Le cellule THP-1 trattate con PAI e PVA, sia a 48 che a 72 ore, mostrano un *pattern* di fluorescenza paragonabile a quelle del controllo positivo sia come intensità che come localizzazione degli antigeni. E' possibile affermare che entrambi gli *hydrogels* influenzano positivamente il differenziamento delle THP-1 che sembrerebbero oltretutto il miglior modello di studio per questo processo, dal momento che le U937, pur essendo caratterizzate da cambiamenti morfologici in presenza di PAI e PVA, falliscono nell'esprimere marcati livelli di antigeni

macrofago-specifici: ciò suggerisce una transizione delle U937 da uno stadio di promonociti ad uno stadio intermedio di macrofagi immaturi piuttosto che a quello di cellule mature (Hass R. *et al.*, 1989).

In questo lavoro sperimentale è stata analizzata un'altra caratteristica importante del differenziamento macrofagico, ossia la capacità cellulare di legare e/o internalizzare corpi estranei. I processi di internalizzazione vengono raggruppati sotto il nome di "endocitosi" e comprendono due meccanismi principali: la fagocitosi, cioè l'internalizzazione di grandi particelle, e la pinocitosi, ossia l'internalizzazione di fluidi o soluti. Abbiamo valutato entrambi i processi.

Il test di endocitosi in fase fluida ha dimostrato che entrambi gli *hydrogels* non influenzano la capacità endocitotica di U937 e THP-1; infatti, la percentuale di cellule che endocita il colorante fluorescente *lucifer yellow* dopo trattamento di 48 e 72 ore con i polimeri è paragonabile al controllo negativo. Il test ha comunque messo in evidenza che il numero di cellule che endocitano dopo 48 ore di incubazione con i polimeri è, per entrambe le linee, più alto nella seconda ora di incubazione con il colorante. Questo *trend* si inverte alle 72 ore, dove osserviamo una percentuale di cellule maggiore che endocita entro la prima ora. Ciò indica che entrambe le linee, lasciate a differenziare per due giorni, necessitano di più tempo per endocitare rispetto alle stesse incubate per tre. Un'altra osservazione generale è che la percentuale di cellule THP-1 che endocitano dopo i relativi trattamenti è maggiore (circa il doppio) rispetto alla stessa percentuale di U937; ciò ancora una volta è da attribuirsi al differente stadio differenziativo in cui si trovano le due linee monocitarie.

Il test di fagocitosi con particelle di latex effettuato sulle THP-1 ha invece dimostrato che soprattutto il PVA stimola in queste cellule una discreta attività fagocitica già dopo 48 ore di incubazione con il polimero; a 72 ore sembra che anche il PAI mostri questa lieve induzione che, per entrambi i polimeri, aumenta anche con il crescere dei tempi di incubazione (da 4 a 6 ore) con le particelle. La precoce induzione della fagocitosi in presenza di PVA può trovare spiegazione nelle sue caratteristiche strutturali, poiché si tratta di un polimero riassorbibile, con struttura amorfa che proprio in virtù della sua degradabilità potrebbe attivare i monociti a fagocitare. Al contrario, il PAI è più resistente alla fagocitosi essendo caratterizzato da una struttura altamente organizzata che lo rende simile ad una "endoprotesi" (Lahiri A and Waters R., 2007).

Per completare questo lavoro sperimentale si è valutata la reattività immunologica dei biopolimeri, dal momento che, il rilascio di citochine proinfiammatorie, indice di attivazione macrofagica, è il principale meccanismo di innesco della risposta ad un corpo estraneo; è bene valutare accuratamente questo parametro poiché una risposta troppo aggressiva può compromettere il buon esito dell'impianto.

I risultati ottenuti hanno confermato che PAI e PVA sono altamente biocompatibili o per meglio dire "immunocompatibili": le cellule THP-1 lasciate ad incubare per diversi tempi con entrambi gli *hydrogels* non rilasciano alcuna delle citochine analizzate (TNF- α , IL-1 β e IL-6); soltanto il trattamento con l'estere del forbolo TPA sembra stimolare significativamente queste cellule a produrre i mediatori dell'infiammazione. Le U937 si comportano nello stesso modo, ma con una distinzione: sembra che neanche il TPA riesca ad attivarle completamente dal momento che, anche in sua presenza, queste cellule producono quantità di TNF- α e IL-1 β paragonabili al controllo negativo; ancora una volta ciò è dovuto al loro stadio differenziativo molto precoce. In entrambe le linee monocitarie si osserva una lieve induzione del rilascio di TNF- α da parte del polivinilalcol e ciò può essere attribuito alla sua biodegradabilità; del resto l'analisi del rilascio di ossido nitrico, anch'esso importante mediatore dell'infiammazione, nelle RAW 264.7 ha evidenziato come queste cellule, dopo trattamento con polivinilalcol per 48 ore, producano considerevoli quantità di questo mediatore.

Possiamo concludere affermando che questo lavoro sperimentale ha messo in luce come i biopolimeri presi in esame siano ottimi candidati per le applicazioni cliniche per cui sono stati progettati; la loro elevata biocompatibilità tuttavia non esclude che essi possano interagire attivamente con le strutture cellulari con cui vengono a contatto. Proprio tale interazione produce quelle modificazioni morfologiche, biochimiche, funzionali che sono state riscontrate nei nostri studi e che di volta in volta sembrano dipendere dallo stadio differenziativo cellulare e dalle particolari caratteristiche strutturali del polimero.

In ogni caso, soltanto ulteriori studi *in vivo* potranno fornire una visione più chiara e più completa di come questi biomateriali si comportino in un contesto complesso e dinamico come l'ambiente biologico reale.

BIBLIOGRAFIA

Abbas A.K., Lichtman A.H., Pober J.S. Cytokines. In: Scmitt W., Hacker H.N., Ehlers J. Ed *Cellular and Molecular Immunology*, fourth edition, Saunders **2000**.

Acquapendente G.F. *De Chirurgicis Operationibus, Operum, Chirurgicum pars posterior vel pentateuchi Chirurgichi, venetiis, apud Robertum Megliettum, 1616*.

Albert M.L., Sauter B., Bhardwaj N. *Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I restricted CTLs*. Nature, **1998**; 392: 86-89.

Alessio M., De Monte L., Scirea A., Gruarin P., Tandon N.N. and Sitia R. *Synthesis, Processing and intracellular Transport of CD36 during Monocytic Differentiation*. The Journal of Biological Chemistry, **1996**; Vol. 271, No.3, pp.1770-1775.

Ancuta P., Rao R., Moses A., Mehle A., Shaw S.K., Luscinskas F.W., Gabuzda D. *Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16+ monocytes*. J. Exp. Med., **2003**; 197: 1701-1707.

Anderson J.M. and Schoen F.J. *In Vivo Assessment of Tissue Compatibility*. Biomaterials Science, 2nd Edition, **2004**, cap. 5, pp. 360-366.

Anderson J.M., Biomaterials Science, 2nd Edition, **2004**; cap. 4 pp.296-304.

Anderson J.M., Rodriguez A., Chang D.T. *Foreign body reaction to biomaterials*. Seminars in Immunology XXX **2007**.

Anstey N.M., Weinberg J.B., Hassanali M.Y., Mwaikambo E.D., Manyenga D., Misukonis M.A., Arnelle D.R., Hollis D., McDonald M.I., Granger D.L. *Nitric oxide in Tanzanian children with malaria: Inverse relationship between malaria severity and nitric oxide production/nitric oxide synthase type 2 expression*. J Exp Med **1996**;184:557-567.

Arndt K.A., LeBoit P.E., Robinson J.K., Wintroub B.U. *What is normal skin?* In: White Jr CR, Bigby M, Sanguñeza OP, editors. *Cutaneous medicine and surgery: an integrated program in dermatology*, vol. 1. Philadelphia: W.B. Saunders Company; **1996**; pp. 3–45.

Auwerx J. *The human leukaemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation*. *Experientia*, **1991**, 47(1):22-31.

Babensee J.E., Anderson J.M., McIntire L.V., Mikos A.G. *Host response to tissue engineered device*. *Adv. Drug. Delivery Rev.*, **1998**; 33: 111-139.

Babior B.M., Lambeth J.D., Nauseef W. *The neutrophil NADPH oxidase*. *Arch Biochem Biophys* **2002**;397:342–344.

Baeten D., Boots A.M.H., Steenbakkens P.G.A., Elewaut D., Bos E., Verheijden G.F.M., Verbruggen G., Miltenburg A.M.M., Rijnders A.W.M., Veys E.M., de Keyser F. *Human cartilage gp-39+, CD16+ monocytes in peripheral blood and synovium-correlation with joint destruction in rheumatoid arthritis*. *Arthr. Rheum.*, **2000**; 43: 1233-1243.

Bakri Y., Sarrazin S., Mayer U.P., Tillmanns S., Nerlov C., Boned A. and Sieweke M.H. *Blood* **2005**; 105, 2707–2716.

Bancherau J., Steinman R.M. *Dendritic cells and the control of immunity*. *Nature* **1998**; 392: 245-52.

Barbucci R., Busi E., Magnani A., Ferruti P., Ranucci E., Taraviras S. *Biomaterials*. *Biomateriali*, estratti da *La Chimica e l'Industria* -anno **76/1994**, pp. 3- 9.

Barry L.E. and Dadvand B. *Injectable Soft-Tissue Fillers: Clinical Overview*. *Plast. Reconstr. Surg.* **2006**; 118: 98e-106e.

Batich C., Williams J., King R. *Toxic hydrolysis product from a biodegradable foam implant*. *J Biomater Res* **1989**; 23: 311-319.

Baumann L. *Replacing dermal constituents lost through aging with dermal fillers.* Semin Cutan Med Surg **2004**; 23:160–166.

Baumgartner J.M., Cooper S.L. *Influence of thrombus components in mediating staphylococcus aureus adhesion to polyurethane surfaces.* J Biomed Mater Res **1998**; 40:4, pp. 660-70.

Behling C.A., Spector M. *Quantitative characterization of cells at the interface of long-term implants of selected polymers.* J Biomed Mater Res **1986**; 20, pp. 653-666.

Bennet S.R.M., Carbone F.R., Karamalis F., Flavell R.A., Miller J.F.A.P, Heath W.R. *Help for cytotoxic T-cell responses is mediated by CD40 signalling.* Nature **1998**; 394: 478-80.

Biswas S.K., Gangi L., Paul S., Schioppa T., Sacconi A., Sironi M., Bottazzi B. *A distinct and unique transcriptional program expressed by tumor-associated macrophages (defective NF-kappaB and enhanced IRF-3/STAT1 activation).* Blood, **2006**; 107: 2112–2122.

Bloebaum R.D., Lundeen G.A., Bachus K.N., Ison I., Hofmann A.A. *Dissolution of particulate hydroxyapatite in a macrophage organelle model.* J. Biomed. Mater. Res. **1998**; 40: 104-114.

Bonora F. “*Cenni storici sull’evoluzione delle protesi artificiali*” in *Pagine di Storia della Medicina*, Roma **1965**.

Brodbeck W.G., Macewan M., Colton E., Meyerson H., Anderson J.M. *Lymphocytes and the foreign body response: Lymphocyte enhancement of macrophage adhesion and fusion.* J Biomed Mater Res **2005**; 74: 222-229.

Brodbeck W.J., Nakayama Y., Matsuda T., Colton E., Ziats N.P., Anderson J.M. *Biomaterial surface chemistry dictates adherent monocyte/macrophage cytokine expression in vitro.* Cytokine **2002**; 18, pp. 311-319.

Brodbeck W.J., Platelet J., Voskerician G., Christenson E., Shive M.S. et al. *Biomaterial adherent macrophage apoptosis is increased by hydrophilic and anionic substrates in vivo*. Appl Biolog Sciences **2001**; 99, pp. 10287-10292.

Bujan J, Garcia-Honduvilla N. *Coating PTFE vascular prosthesis with a fibroblastic matrix improves cell retention when subjected to blood flow*. J Biomed Mater Res **1998**; 39: 32-38.

Burger D., Dayer J.M. The role of human T-lymphocyte-monocyte contact in inflammation and tissue destruction. Arthritis Res **2002**; 4 (Suppl 3): S169-S176.

Casavantes L.C., Izabal M. et al: *Stability, tolerance and safety of Bio-Alcamid (polyalkylimide) gel, the injectable endoprosthesis for correction of HIV related facial lipoatrophy (2nd part)*. J Surginews 4:3, Summer **2004**.

Cella M., Scheidegger D., Palmer-Lehmann K., et al. *Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances t cell stimulatory capacity:T-T help via APC activation*. J Exp Med **1996**; 184: 747-52.

Chang D.T., Jones J.A. et al. *Lymphocyte/macrophage interactions: Biomaterial surface-dependent cytokine, chemokine, and matrix protein production*. Inc. J Biomed Mater Res, **2008**.

Chang D.T., Jones J.A., Meyerson H., Colton E., Kwon K., Matsuda T., Anderson J.M. *Lymphocyte/macrophage interactions: Biomaterial surface-dependent cytokine, chemokine, and matrix protein production*. Inc. J Biomed Mater Res, **2008**.

Chinn J.A., Sauter J.A. *Blood and tissue compatibility of modified polyester: thrombosis, inflammation and healing*. J. Biomed. Mater. Res. **1998**; 39: 130-136.

Chung T.W., Liu D.Z., Wang S.Y. and Wang S.S. *Enhancement of the growth of human endothelial cells by surface roughness at nanometer scale*. Biomaterials **2003**; 24(25):4655-61.

Cochran D.L., Schenz R.K., Lussi A., Higginbottom F.L., Buser D. *Bone response to unloaded and loaded titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: a histometric study in the canine mandible.* J. Biomed. Mater. Res. **1998**; 40: 1-11.

Collier T.O., Anderson J.M. *Protein and surface effects on monocyte and macrophage adhesion, maturation, and survival.* J Biomed Mater Res **2000**; 60, pp. 487-496.

Coopman S.A., Garmyn M., Gonzales-Serva A., Glogau R. Photodamage and photoaging. In: White Jr C.R., Bigby M., Sanguenza O.P., editors. *Cutaneous medicine and surgery: an integrated program in dermatology, vol. 1.* Philadelphia: W.B. Saunders Company, **1996**; pp. 732-750.

Da Silva R.P. and Gordon S. *Phagocytosis stimulates alternative glycosylation of macrosialin (mouse CD68), a Macrophage-specific endosomal protein.* Biochem. J. **1999**; 338, 687-694.

Davis M.W., Vacanti J.P. *Toward development of an implantable tissue engineered liver.* Biomaterials **1996**; 17: 365-371.

De Merlis C.C. and Schoneker D.R. *Review of the oral toxicity of polyvinyl alcohol (PVA).* Food and Chemical Toxicology **2003**; 41: 319-326.

Delamarre L., Pack M., Chang H., Mellman J., Trombetta E.S. *Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate.* Science, **2005**; 307: 1630-1634.

Desnues B., Lepidi H., Raoult D., Mege J.L. *Whipple disease: intestinal infiltrating cells exhibit a transcriptional pattern of M2/alternatively activated macrophages.* J. Infect. Dis., **2005**; 192: 1642–1646.

Devitt A., Molfatt O.D., Raykundalia C., Capra J.D., Simmons D.L., Gregory C.D. *Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells.* Nature, **1998**; 392: 505-509.

Devitt A., Pierce S., Oldreive C., Shingler W.H. and Gregory C.D. *CD14-dependent clearance of apoptotic cells by human macrophages: the role of phosphatidylserine*. Cell Death and Differentiation **2003**; 10, 371-382.

Dinarello C.A., Cannon J.G., Wolff S.M., Bernheim H.A. et al. *Tumor necrosis factor (cachetin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1*. J Exp Med **1986**; 163, pp. 1433-1450.

Dini L., Panzarini E., Miccoli M.A., Miceli V., Protopapa C., Ramires P.A. *In vitro study of the interaction of polyalkilimide and polyvinyl alcohol hydrogels with cells*. Tissue and Cell **2005**; 479-487.

Doi K., Matsuda T. *Enhanced vascularization in a microporous polyurethane graft impregnated with basic fibroblastic growth factor and heparin*. J Biomed Mater Res **1997**; 37:3, pp. 361-70.

Doi K., Matsuda T. *Significance of porosity and compliance of microporous, polyurethane-based microarterial vessel on neoarterial wall regeneration*. J Biomed Mater Res **1997**; 37:4, pp. 573-84

Doi K., Nakayama Y., Matsuda T. *Novel compliant and tissue-permeable microporous polyurethane vascular prosthesis fabricated using an excimer laser ablation technique*. J Biomed Mater Res **1996**; 31:1, pp. 27-33.

Duffield, J. S. *The inflammatory macrophage: a story of Jekyll and Hyde*. Clin Sci (Lond) **2003**; 104, 27–38.

Duffy D.M. *Liquid silicone for soft tissue augmentation*. Dermatol Surg **2005**; 31:1530–1541.

Eberhart A., Zhang Z., Guidoni R., Laroche G., Guay L. et al. *A new generation of polyurethane vascular prosthesis: rara avis or ignis factuus?*. J Biomed Mater Res **1999**; 48:4, pp. 546-58.

Erodoto. *Le storie*, Firenze, ed. Sansoni **1951**.

Feldman A.M., Combes A., Wagner D., Kadakomi T. et al. *The role of tumor necrosis factor in the pathophysiology of heart failure*. J Am Coll Cardiol **2000**; 35, pp. 537-544.

Fernandez E.J., Lolis E. *Structure, function and inhibition of chemokines*. Annu Rev Pharmacol Toxicol **2002**; 42:469-99.

Fischer D., Van der Weyden M.B., Snyderman R., Kelley W.N. *A role for adenosine deaminase in human monocyte maturation*. J Clin Invest **1976**; 58, 399–407.

Flaharty P. *Radiance*. Facial Plast Surg **2004**; 20:165–169.

Flora P.K., Gregory C.D. *Recognition of apoptotic cells by human macrophages – inhibition by monocyte/macrophage-specific monoclonal antibody*. Eur. J. Immunol., **1994**; 24: 2625-2632.

Fogg D.K., Sibon C., Miled C., Jung S., Aucouturier P., Littman D.R., Cumano A., Geissmann F. *A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells*. Science, **2006**; 311: 83-87.

Fournier E., Passirani C., Montero-Menei C.N., Benoit J.P. *Biocompatibility of implantable synthetic polymeric drug carriers: focus on brain biocompatibility*. Biomaterials **2003**; 24 3311-3331.

Galletti P.M., Boretus J.W. J. Biomed. Mater. Res. **1983**; (17) 539-555.

Gallina G., Dolcetti L., Serafini P., De Santo C., Marigo I., Colombo M.P., Basso G. *Tumors induce a subset of inflammatory monocytes with immunosuppressive activity on CD8+ T cells*. J. Clin. Invest., **2006**; 116: 2777–2790.

Geissmann F., Jung S., Littmann D.R. *Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties.* Immunity, **2003**; 19: 71-82.

Gemmel C.H., Ramirez S.M., Yeo E.L., Sefton M.V. *Platelet activation in whole blood by artificial surfaces: identification of platelet-derived microparticles and activated platelet binding to leukocytes as material-induced activation events.* J Lab Clin Med **1995**; 125, pp. 276-87.

Gentile F.T., Doherty E.J., Rein D.H., Shoichet M.S., Winn S.R. *Polymer science for macroencapsulation of cells for central nervous system transplantation.* React. Polym., **1995**; 25: 207-227.

Gerszten R.E., Garcia-Zepeda E.A., Lim Y.C. et al. *MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions.* Nature **1999**; 398:718-23.

Ghassabeh G.H., De Baetselier P., Brys L., Noel W., Van Ginderachter J. A., Meerschaut S., Beschin A. *Identification of a common gene signature for type II cytokine-associated myeloid cells elicited in vivo in different pathologic conditions.* Blood, **2006**; 108: 575–583.

Gilroy D.W., Lawrence T., Perretti M. & Rossi A.G. *Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery.* Nat Rev Drug Discov **2004**; 3, 401–416.

Giridhar G., Myrvik Q.N., Gristina A.G. *Biomaterial-induced dysfunction in the capacity of rabbit alveolar macrophages to kill Staphylococcus epidermidis RP12.* J Biomed Mater Res **1995**; 29:1179–1183.

Glavas I.P.. *Filling agents.* Ophthalmol Clin North Am **2005**; 18:249–257.

Gorbet M.B., Sefton M.V. *Biomaterial-associated thrombosis: roles of coagulation factors, complement, platelets and leucocytes.* Biomaterials **2004**; (25) 5681-5703.

Gordon S. *Alternative activation of macrophages.* Nat Rev Immunol **2003**; 3, 23–35.

Gordon S., Taylor P.R. *Monocyte and macrophage heterogeneity*. Nat. Rev. Immunol., **2005**; 5: 953-964.

Grage-Griebenow E., Zawatzky R., Kahlert H., Brade L., Flad H.D., Ernst M. *Identification of a novel dendritic cell-like subset of CD64+/CD16+ blood monocytes*. Eur. J. Immunol., **2001**; 31: 48-56.

Greenwalt D.E., Lipsky R.H., Ockenhouse C.F., Ikeda H., Tandon N.N. and Jamieson G.A. Blood **1992**; 80, 1105-1115.

Gretzer C. *Macrophage-material surface interactions*, Goteborg: Goteborg University, thesis. **2000**.

Gretzer C., Gisselalt K., Liljensten E., Rydèn L., Thomsen P. *Adhesion, apoptosis and cytokine release of human mononuclear cells cultured on degradable poly(urethane urea), polystyrene and titanium in vitro*. Biomaterials **2003**; 24 2843–2852.

Gretzer C., Werthen M., Thomsen P. *Apoptosis and cytokine release in human monocytes cultured on polystyrene and fibrinogen-coated polystyrene surfaces*. Biomaterials **2002**; 23 1639–1648.

Grunwald U., Fan X., Jack R.S., Workalemahu G., Kallies A., Stelter F., Schutt C. *Monocytes can phagocytose gram-negative bacteria by a CD14 dependent mechanism*. J Immunol **1996**;157: 4119–25.

Haskò G., Palcher P., Deitch E.A., Vizi E.S. *Shaping of monocyte and macrophage function by adenosine receptors*. Pharmacology & Therapeutics, **2007**; 113: 264-275.

Hass R., Bartels H., Topley N., Hadam M., Kohler L., Goppelt-Strube M., Resch K. *TPA-induced differentiation and adhesion of U937 cells: changes in ultrastructure, cytoskeletal organization and expression of cell surface antigens*. European Journal of Cell Biology **1989**; 48, 282-293.

Helming L., Gordon S. *Macrophage fusion induced by IL-4 alternative activation is a multistage process involving multiple target molecules*. Eur. J. Immunol., **2007**; 37: DOI 10.1002/eji.200636788.

Hench L., Wilson J. *An introduction to Bioceramics*, Advance series in ceramics, vol. 1. Singapore, *World Scientific Pub.* **1993**; 3-5.

Hitchins V.M., Mtungwa A.R. and Merritt K. *Detection of LPS by Measuring Nitric Oxide (NO) Production in RAW 264.7 Murine Macrophage Cells*.

Hoffstein S.T., Gennaro D.E., Manzi R.M. *Surface contact inhibits neutrophil superoxide generation induced by soluble stimuli*. Lab Invest **1985**;52:515–522.

Holness C.L., da Silva R.P. *and al.* J. Biol. Chem. **1993**; 268, 9661-9666.

Hoves S., Krause S.W., Schutz C., Halbritter D., Scholmerich J., Herfarth H., Fleck M. *Monocyte-derived human macrophages mediate anergy in allogeneic T cells and induce regulatory T cells*. J Immunol **2006**; 177: 2691-2698.

Imhof B.A., Aurrand-Lions M. *Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes*. Nat Rev. Immunol. **2004**; 4, 432-444.

Isolyser Company, **1998**. Isolyser Company, Inc. 4320 International Boulevard, N.W., Norcross, GA.

Johl S.S. and Burgett R.A. *Dermal filler agents: a practical review*. Current Opinion in Ophthalmology, **2006**; 17: 471-479.

Johnson R.J. *The Complement System*. Biomaterials Science, 2nd Edition, **2004**, cap 4 pp. 318-328.

Jones D.A, Smith C.W, Mcintire L.V. *Leucocyte adhesion under flow conditions: principles important in tissue engineering*. Biomaterials **1996**; 17, pp. 337-347.

Jung S., Unutmaz D., Wong P., Sano G.L., los Santos K., Sparwasser T., Wu S.J., Vurthoori S., Ko K., Zavala F., Pamer E.G., Littman D.R., Lang R.A. *In vivo depletion of CD11c+ dendritic cells abrogates priming of CD8+ T cells by exogenous cell-associated antigens.* Immunity, **2002**; 17: 211-220.

Kang T.B., Ben-Moshe T., Varfolomeev E.E., Pewzner-Jung Y., Yogev N., Jurewicz A., Waisman A., Brenner O., Haffner R., Gustafsson E., Ramakrishnan P., Lapidot T. and Wallach D. J. Immunol. **2004**; 173, 2976–2984.

Kao W.J. *Evaluation of protein-modulated macrophage behavior on biomaterials: designing biomimetic materials for cellular engineering.* Biomaterials **1999**; 20, pp. 2213-2221.

Kaplan S.S., Basford R.E., Mora E., Jeong M.H., Simmons R.L.. *Biomaterial-induced alterations of neutrophil superoxide production.* J Biomed Mater Res **1992**; 26:1039–1051.

Kelly L.M., Englmeier U., Lafon I., Sieweke M.H. and Graf T. EMBO J. **2000**; 19, 1987–1997.

Khansari D.N, Murgo A.J, Faith R.E. *Effects of stress on the immune system.* **1990**; Immunol. Today 11, pp. 170-175.

Kim Y.H., Park K.D. *Medical polymers for cardiovascular applications.* Biomaterials Res. **1997**; 1: 34-37.

Kock F., Stanzl U., Jennewein P., et al. *High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and down regulation by IL-4 and IL-10.* J Exp Med **1996**; 184: 741-47.

Koj A. *Biological functions of acute phase proteins.* In: Gordon A.H., Koj A. *The Acute-Phase Response to Injury and Infection: The Roles of Interleukin 1 and other Mediators.* Vol. 10. Elsevier Amsterdam, **1985**; pp. 145-160.

Kuhn, L.T. *Introduction to Biomedical Engineering*, 2nd Edition, **2005**; cap.6, pp. 256-275.

Kushner I. *The phenomenon of the acute phase response*. Ann. NY Acad. Sci. **1982**; 89, pp. 39-48.

Kzhyshkowska J., Workman G., Cardo-Vila M., Arap W., Pasqualini R., Gratchev A., Krusell L. *Novel function of alternatively activated macrophages: stabilin-1-mediated clearance of SPARC*. J. Immunol., **2006**; 176: 5825–5832.

Lafarge Claoue B. and Rabineau P. *The Polyalkylimide Gel: Experience with Bio-Alcamid™* Semin Cuan Med Surg **2004**; 23:236-240.

Lahiri A., Waters R. Experience with Bio-Alcamid, a new soft tissue endoprosthesis. British Association of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgeons **2007**.

Lai Y., Feldman K.L., Clark R.S.B. *Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs)*. Crit Care Med **2005**; Vol. 33, No. 12 (Suppl.).

Lampin M., Warocquier-Clerout R., Legris C., Degrange M., Sigot-Luizard M.F. *Correlation between substratum roughness and wettability, cell adhesion, and cell migration*. John Wiley & Sons, Inc. **1997**. CCC 0021-9304/97/010099-10.

Langer R.S., Vacanti JP. *Tissue engineering*. Science **1993**; 260:920–926.

Langer R.S., Vacanti JP.. *Tissue engineering: the challenges ahead*. Science **1999**; 63–65.

Langrehr J.M., Murase N., Markus P.M., Cai X., Neuhaus P., Schraut W., Simmons R.L., Hoffman R.A. *Nitric oxide production in host-versus-graft and graft-versus-host reactions in the rat*. J Clin Invest **1992**; 90:679–683.

Lanza R.P., Langer R., Chick W. *Principles of tissue engineering*, CA, San Diego, Academic Press, **1997**; 9-50.

Launay S., Hermine O., Fontenay M., Kroemer G., Solary E. and Garrido C. *Oncogene* **2005**; 24, 5137–5148.

Laurencin C.T., Elgendy H. *The biocompatibility and immunotoxicity avaluation of implanted controlled release systems*. *J. Controlled Release*, **1994**; 57: 107-113.

Lavik E., Langer R. *Tissue engineering: current state and perspectives*. *Appl Microbiol Biotechnol* **2004**; 65: 1-8.

Lemaire I., Falzoni S., Leduc N., Zhang B., Pellegatti P., Adinolfi E., Chiozzi P., Di Virgilio F. *Involvement of the Purinergic P2X7 Receptor in the formation of multinucleated giant cells*. *J. Immunol.*, **2006**; 177: 7257–7265.

Leon B., Lopez-Bravo M., Ardavin C. *Monocyte-derived dendritic cells*. *Semin. Immunol.*, **2005**; 17: 313-318.

Lin T.H., Rosales C., Mondal K., Bolen J.B., Haskill S., Juliano R.L. *Integrin-mediated tyrosine phosphorylation and cytokine message induction in monocytic cells-a possible signaling role for the syk tyrosine kinase*. *J Biol Chem*. **1995**; 270 (27), pp. 16179-89.

Lin T.H., Yurochko A., Kornberg L., Morrisi J., Walker J.J., Haskill S. et al. *The role of protein tyrosine phosphorylation in integrin-mediated gene induction in monocytes*. *J Cell Biol*, **1994**; 126 (6), pp. 1585-93.

Liu S.Q., Kodama M. *Porous polyurethane vascular prostheses with variable compliances*. *J Biomed Mater Res* **1992**; 26:11, pp. 1489-502.

Macatonia S.E., Hosken N.A., Litton M. et al. *Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of TH1 cells from the naive CD4⁺ T cells*. *J Immunol* **1995**; 154: 5071-79.

MacEwan M.R., Brodbeck W.G., Matsuda T., Anderson J.M. *Student Research Award in the Undergraduate Degree Candidate category, 30th Annual Meeting of the Society for Biomaterials*. Memphis, Tennessee, April 27-30, **2005**.

Monocyte/lymphocyte interactions and the foreign body response: in vitro effects of biomaterial surface chemistry. J Biomed Mater Res A **2005**; 74: 285-293.

MacMicking J.D., North R.J., LaCourse R., Mudgett J.S., Shah S.K., Nathan C.F. *Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis.* Proc Natl Acad Sci USA **1997**; 94:5243–5248.

Mantovani A., Sica A., Locati M. *New vistas on macrophage differentiation and activation.* Eur. J. Immunol. **2007**; 37:14-16.

Mantovani A., Sica A., Sozzani S., Allavena P., Vecchi A., Locati M. *The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization.* Trends Immunol., **2004**; 25: 677–686.

Martinez F.O., Gordon S., Locati M., Mantovani A. *Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression.* J. Immunol., **2006**;177: 7303–7311.

Matarasso S.L., Carruthers J.D., Jewell M.L., Restylane Consensus Group. *Consensus recommendations for soft-tissue augmentation with nonanimal stabilized hyaluronic acid (Restylane).* Plast. Reconstr. Surg., **2006**; 117 (3 suppl.): 3S-34S.

McKenney J.K., Weiss S.W. and Folpe L. *CD31 Expression in Intratumoral Macrophages.* The American Journal of Surgical Pathology **2001**; 25(9): 1167-1173.

McNally A.K., Anderson J.M. *β_1 and β_2 integrins mediate adhesion during macrophage fusion and multinucleated foreign body giant cell formation.* Am J Pathol **2002**; 160, pp. 621-630.

Meghari S., Berruyer C., Lepidi H., Galland F., Naquet P., Mege J.L. *Vanin-1 controls granuloma formation and macrophage polarization in *Coxiella burnetii* infection.* Eur. J. Immunol. **2007**; 37: DOI 10.1002/ eji.200636054.

Merrill J.T., Shen C., Schreiber D., Coffey D., Zakharenko O., Fisher R., et al. *Adenosine A1 receptor promotion of multinucleated giant cell formation by human monocytes: a mechanism for methotrexate-induced nodulosis in rheumatoid arthritis.* *Arthritis Rheum* **1997**; 40, 1308–1315.

Messer R.L.W., Lewis J.B., Wataha J.C., Adams Y., Tseng W.Y. *Cytokine Secretion From Monocytes Persists Differentially After Activator Removal—One Mechanism of Long-Term Biological Response to Implants.* Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). **2007**; DOI: 10.1002/jbm.b.30766.

Metha Damani A., Markowicz S., Engleman E.G. *Generation of antigen-specific CD8⁺ CTLs from naive precursors.* *J Immunol* **1994**; 153: 996-1003.

Miller K.M. and Anderson J.M. *Human monocyte/macrophage activation and interleukin 1 generation by biomedical polymers.* *Journal of Biomedical Materials Research*, **1988**; Vol. 22, 713-731.

Miller K.M. and Anderson J.M. *Human monocyte/macrophage activation and interleukin 1 generation by biomedical polymers.* *Journal of Biomedical Materials Research*, **1998**; Vol. 22, 713-731.

Mirkovitch V., Akutsu T., Kolff W.J. *Intracardiac thrombosis on plastics in relation to construction of artificial valves.* *J Appl Physiol* **1961**; 16, pp. 105-14.

Miyamoto K., Surgimoto T., Okada M., Maeda S. *Experimental studies on application of small-caliber vascular prosthesis produced by polyurethane.* *Ann Thorac Cardiovasc Surg.* **1999**; 5:3, pp. 174-81.

Molfatt O.D., Devitt A., Bell E.D., Simmons D.L., Gregory C.D. *Macrophage recognition of ICAM-3 on apoptotic leukocytes.* *J. Immunol.*, **1999**; 162: 6800-6810.

Moncada S. & Higgs E.A. *Nitric oxide and the vascular endothelium.* *Handb Exp Pharmacol* **2006**; (176 Pt 1), 213–254.

- Mosman T.J. *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxic assays*. J. Immunol. Methods **1983**; 65, 55.
- Mosser, D.M. *The many faces of macrophage activation*. J Leukoc Biol **2003**; 73, 209–212.
- Murray C.A., Zloty D., Warshawski L. *The evolution of soft tissue fillers in clinical practice*. Dermatol Clin **2005**; 23:343–363.
- Nagaoka S., Tanzawa H., Suzuki J. *Cell proliferation on hydrogels*. In Vitro Cell. Dev. Biol., **1990**; 26(1): 51-56.
- Naito M., Umeda S., Yamamoto T., Moriyama H., Umezu H., Hasegawa, G., et al. *Development, differentiation, and phenotypic heterogeneity of murine tissue macrophages*. J Leukoc Biol **1996**; 59, 133–138.
- Najar H.M., Ruhl S., Bru-Capdeville A. C., Peters J.H. *Adenosine and its derivatives control human monocyte differentiation into highly accessory cells versus macrophages*. J Leukoc Biol **1990**; 47, 429–439.
- Narins RS, Bowman PH. *Injectable skin fillers*. Clin Plast Surg **2005**; 32: 151–162.
- Narita T., Hirai A., Xu J., Gong J.P., Osada Y. *Substrate effects of gel surfaces on cell adhesion and disruption*. Biomacromolecules **2000**; 1(2), 162-167.
- Ness T.L., Ewing J.E., Hogaboam C.M., Kunkel S.L. *CCR4 is a key modulator of innate immune responses*. J. Immunol., **2006**; 177: 7531–7539.
- Nilsson B., Nilsson Ekdahl K., Mollnes T.E., Lambris J.D. *The role of complement in biomaterial-induced inflammation*. Molecular Immunology **2007**; 44 82-94.
- Noel W., Raes G., Hassanzadeh Ghassabeh G., De Baetselier P., Beschin A. *Alternatively activated macrophages during parasite infections*. Trends Parasitol., **2004**; 20: 126–133.

Northup S.J. *In Vitro Assessment of Tissue Compatibility*. Biomaterials Science, 2nd Edition, **2004**, cap. 5, pp. 356-360.

Nuttelman C.R., Mortisen D.J., Henry S.M., Anseth K.S. Attachment of fibronectin to poly(vinyl alcohol) hydrogels promotes NIH3T3 cell adhesion, proliferation, and migration. John Wiley & Sons, Inc. **2001**.

Ochoa J.B., Udekwu A.O., Billiar T.R., Curran R.D., Cerra F.B., Simmons R.L., Peitzman A.B.. *Nitrogen oxide levels in patients after trauma and during sepsis*. Ann Surg **1991**; 214:621–626.

Ogawa K., Funaba M., Chen Y., Tsujimoto M. *Activin A functions as a Th2 cytokine in the promotion of the alternative activation of macrophages*. J. Immunol., **2006**; 177: 6787–6794.

Okada M., Suzuki K., Takada K., et al. *Detection of up-regulated genes in thrombin-stimulated human umbilical vein endothelial cells*. Thromb Res **2006**;118:715-21.

Okoshi T. *New concept of microporous structure in small diameter vascular prosthesis*. Artif Organs **1995**; 19:1, pp. 27-31.

Ou J., Carlos T.M., Watkins S.C., Saavedra J.E., Keefer L.K., Kim Y.M., Harbrecht B.G., Billiar T.R. *Differential effects of non selective nitric oxide synthase (NOS) and selective inducible NOS inhibition on hepatic necrosis, apoptosis, ICAM-1 expression, and neutrophil accumulation during endotoxemia*. Nitric Oxide **1997**;1:404–416.

Owens J.M.. *Soft tissue implants and fillers*. Otolaryngol Clin N Am **2005**; 38:361–369.

Pacini S., Aterini S., Salvadori M. *Cellular proliferation and second messenger formation altered by dialysis membranes*. Nephrol Dial Transplant, **1997**; 12: 500.

Pacini S., Ruggiero M., Cammarota N. *et al.* *Bio-alcamid, a novel prosthetic polymer, does not interfere with morphological and functional characteristics of human skin fibroblasts.* *Plast Reconstr Surg* **2003**; 111:489-91.

Pacini S., Ruggiero M., Morucci G., Cammarota N., Protopapa C., Gulisano M. *Bio-Alcamid: a novelty for reconstructive and cosmetic surgery.* *J Surginews* 3:3, Spring **2004**.

Passlick B., Flieger D., Ziegler-Heitbrock H.W. *Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood.* *Blood*, **1989**; 74: 2527-2534.

Peerschke E.I., Ghebrehiwet B. *Platelet receptors for the complement component C1q: implications for hemostasis and thrombosis.* *Immunology* **1998**; 199(2): 239-49.

Pesce J., Kaviratne M., Ramalingam T.R., Thompson R.W., Urban J.F., Jr. Cheever A.W., Young D.A. *The IL-21 receptor augments Th2 effector function and alternative macrophage activation.* *J. Clin. Invest.*, **2006**;116: 2044–2055, 2006.

Pinchuk L. *A review of the biostability and carcinogenicity of polyurethanes in medicine and the new generation of “biostable” polyurethanes.* *J Biomater Sci Ed.* **1994**; 6(3):225-267.

Plinius C.S. *Historiae naturali libri XXXVII*, Venezia **1571**.

Port F. *OPTN/SRTS annual report.* Scientific Registry of Transplant Recipients and Organ Procurement Transplantation Network, Washington, D.C **2002**.

Pulliam L., Gascon R., Stubblebine M., McGuire D., McGrath M.S. *Inique monocyte subset in patients with AIDS dementia.* *Lancet*, **1997**; 349: 692-695.

Qu C.F., Edwards E.W., Tacke F., Angeli V., Llodra J., Sanchez-Schmitz G., Garin A., Haque N.S., Peters W., van Rooijen N., Sanchez-Torres C., Bromberg J., Charo

J.F., Jung S., Lira S.A., Randolph G.J. *Role of CCR8 and other chemokine pathways in the migration of monocyte-derived dendritic cells to lymph nodes*. J. Exp. Med., **2004**; 200: 1231-1241.

Ramires P.A., Miccoli M.A., Panzarini E., Dini L., Protopapa C. *In Vitro and In Vivo Biocompatibility Evaluation of a Polyalkylimide Hydrogel for soft Tissue Augmentation*. Wiley InterScience **2004**; DOI: 10.1002/Jbm.b30157.

Randolph G.J., Angeli V., Swarts M.A. *Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels*. Nat. Rev. Immunol. **2005**; 5, 617-628.

Randolph G.J., Sanchez-Schmitz G., Liebman R.M., Schakel K. *The CD16(+) (Fcγ-RIII(+)) subset of human monocytes preferentially becomes migratory dendritic cells in a model tissue setting*. J. Exp. Med., **2002**; 196: 517–527.

Rao J., Chi G.C., Goldman M.P. *Clinical comparison between two hyaluronic acid-derived fillers in the treatment of nasolabial folds: hylaform versus restylane*. Dermatol Surg **2005**; 31:1587–1590.

Raschke W.C. *et al. Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus*. Cell **1978**; 15: 261-267.

Ratner B.D. *Introduction to Testing of Biomaterials*. Biomaterials Science, 2nd Edition, **2004**, cap. 5.

Ridge J.P., Di Rosa F., Matzinger P. *A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell*. Nature **1998**; 394: 474-78.

Rihova B. *Biocompatibility of biomaterials: hemocompatibility, immunocompatibility and biocompatibility of solid polymeric materials and soluble targetable polymeric carriers*. Advanced Drug Delivery Reviews **1996**; 21, pp. 157-176.

Romagnani S. *Th1/Th2 cells*. Inflamm Bowel Dis **1999**; 5:285-294.

Roncarolo M.G., Bacchetta R., Bordignon C., Narula S., Levings M.K. Type 1 T regulatory cells. *Immunol Rev* **2001**; 182: 68-79.

Rook G.A.W., Steele J., Umar S. and Dockrell H.M. *A Simple Method for the Solubilization of Reduced NBT, ad Its Use as a Colorimetric Assay for Activation Of Human Macrophages by γ -Interferon.* *J. Immunol. Methods*, **1985**, (82) 161-167.

Saleh M.N., Goldman S.J., LoBuglio A.F., Beall A.C., Sabio H., McCord M.C., Minasian L., Alpaugh R.K., Weiner L.M., Munn D.H. *CD16+ monocytes in patients with cancer: spontaneous elevation and pharmacologic induction by recombinant human macrophage colony-stimulating factor.* *Blood*, **1995**; 85: 2910–2917.

Salernitano E., **2002**. www.technica.net

Sangaletti S., Stoppacciaro A., Guiducci C., Torrisi M.R., Colombo M.P. *Leukocyte, rather than tumor-produced SPARC, determines stroma and collagen type IV deposition in mammary carcinoma.* *J. Exp. Med.*, **2003**; 198: 1475–1485.

Santerre J.P., Labrow R.S. *The effect of hard segment size on the hydrolytic stability of polyether-urea-urethanes when exposed to cholesterol esterase.* *Journal of Biomedical Material Research*, **1997**; Vol 36, pp. 223-232.

Savill J., Dransfield I., Gregory C., Haslett C. *A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses.* *Nat. Rev. Immunol.* **2002**; 2, 965-975.

Sawyer R.T., Strausbauch P.H., Volkman A. *Resident macrophage proliferation in mice depleted of blood monocytes by Sr-89.* *Lab. Invest.*, **1982**; 46: 165–170.

Schaerli P., Willimann K., Ebert L.M., Walz A., Moser B. *Cutaneous CXCL14 targets blood precursors to epidermal niches for Langerhans cell differentiation.* *Immunity*, **2005**; 23: 331–342.

Schlegel R.A., Krahling S., Callahan M.K., Williamson P. *CD14 is a component of multiple recognition systems used by macrophages to phagocytose apoptotic lymphocytes*. Cell Death Differ., **1999**; 6: 583-592.

Schlitt A., Heine G.H., Blankenberg S., Espinola-Klein C., Dopheide J.F., Bickel C., Lackner K.J., Iz M., Meyer J., Darius H., Rupprecht H.J. *CD14+CD16+ monocytes in coronary artery disease and their relationship to serum TNF- α levels*. Thromb. Haem., **2004**; 92: 419–424.

Schmidt D.R., Kao W.J. *The interrelated role of fibronectin and interleukin-1 in biomaterial-modulated macrophage function*. Biomaterials **2006**; 28, pp. 371-382.

Schoen F.J., Biomaterials Science, 2nd Edition, **2004**; cap 4 pp. 293-296.

Schoenberger S.P., Toes R.E.M., van der Voort E.I.H., Offringa R., Melief C.J.M. *T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions*. Nature **1998**; 394: 480-83.

Scimè I. **2003** *DERMAL FILLER : luci e ombre (tecniche-pregi e complicanze)*. www.chirurgiaesteticascime.it

Sclafani A.P., Romo T., Jacono, A.A. *Rejuvenation of the aging lip with an injectable acellular dermal graft (Cymetra)*. Arch. Facial Plast. Surg. **2002**; 4: 252.

Shive M.S., Brodbeck W.G., Colton E., Anderson J.M. *Shear stress and material surface effects on adherent human monocyte apoptosis*. J Biomed Mater Res **2002**; 60, pp. 148-58.

Skalak R, Fox C. *Preface*. In: Tissue engineering, New York: AR Liss **1988**.

Spaans C.J. *Biomedical polyurethanes based on 1,4- butanediisocyanate: an exploratory study (thesis)*. Groningen: State University of Groningen; **2000**.

Stenger S., Donhauser N., Thuring H., Rollinghoff M., Bogdan C. *Reactivation of latent leishmaniasis by inhibition of inducible nitric oxide synthase*. J Exp Med **1996**;183:1501–1514.

Stout, R.D. & Suttles, J. *Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments*. J Leukoc Biol **2004**; 76, 509–513.

Stuehr D. *Mammalian nitric oxide synthases*. Biochim Biophys Acta **1999**;1411:217–230.

Sugiyama T., Wright S.D. *Soluble CD14 mediates efflux of phospholipids from cells*. J. Immunol., **2001**; 166: 826-831.

Suh H., *Recent Advances in Biomaterials*. Yonsei Medical Journal **1998**; Vol. 39, No. 2, pp. 87-96.

Sunderkotter C., Nikolic T., Dillon M.J., van Rooijen N., Stehling M., Drevets D.A., Leenen P.J.M. *Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response*. J. Immunol., **2004**; 172: 4410–4417.

Sundstrom C., Nilsson K. *Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U937)*. Int. J. Cancer **1976**; 17, 565-577.

Szycher M. *Biostability of polyurethane elastomers: a critical review*. J Biomater Appl **1988**; 3: 297-402.

Tacke F., Randolph G.J. *Migratory fate and differentiation of blood monocytes subsets*. Immunobiology, **2006**; 211: 609-618.

Takada Y., Hachiya M., Osawa Y., Hasegawa Y., Andok M., Kobayaashi Y., Akashi M. *12-O-tetradecanoylphorbolo-13-acetate induced apoptosis is mediated by TNF- α in human monocyte U937 cells*. J. Biol. Chem., **1999**; 274(40): 28286-28292.

Takahashi H., Tsuda Y., Takeuchi D., Kobayashi M., Herndon, D.N., Suzuki F. *Influence of systemic inflammatory response syndrome on host resistance against bacterial infections*. Crit. Care Med., **2004**; 32: 1879–1885.

Tang L., Jennings T.A., Eaton J.W. *Mast cells mediate acute inflammatory responses to implanted biomaterials*. Proc Natl Acad Sci U S A **1998**; 95(15):8841–6.

Tarling J.D., Lin H., Hsu S. *Self-renewal of pulmonary alveolar macrophages - evidence from radiation chimera studies*. J. Leukoc. Biol., **1987**; 42: 443–446.

Thaler M.P., Ubogly Z.I. *Artecoll: the Arizona experience and lessons learned*. Dermatol Surg **2005**; 31:1566–1576.

Trinchieri G. *Cytokines acting on or secreted by macrophages during intracellular infection (IL-10, IL-12, IFN- γ)*. Curr Opin Immunol **1997**; 9, pp. 17-23.

Trombetta E.S., Ebersold M., Garrett W., Pypaert M., Mellman I. *Activation of lysosomal function during dendritic cell maturation*. Science, **2003**; 299: 1400–1403.

Ueno A., Mukaram K., Yamanouchi K., Watanabe M., Kondo T. *Thrombin stimulates production of Interleukin-8 in human umbilical vein endothelial cells*. Immunology **1996**; 88:76-81.

Uitto J., Bernstein E.F., McGrath J.A. *The dermis*. In: White Jr CR, Bigby M, Sangu~ eza OP, editors. Cutaneous medicine and surgery: an integrated program in dermatology, vol. 1. Philadelphia: W.B. Saunders Company; **1996**; pp. 857–881.

Unanue E.R. *Antigen-presenting function of the macrophage*. Annu Rev Immunol **1984**; 2, 395–428.

Vacanti C.A. *The history of tissue engineering*. J. Cell. Mol. Med. **2006**; Vol 10, No 3, pp. 569-576.

Valledor A.F., Borrás F.E., Cullell-Young M. & Celada A. *Transcription factors that regulate monocyte/macrophage differentiation*. *J Leukoc Biol* **1998**; 63, 405–417.

Van Furth R., Cohn, Z.A. *Origin and kinetics of mononuclear phagocytes*. *J. Exp. Med.*, **1968**; 128: 415–435.

Van Oeveren W. *Biomaterials for rotary blood pumps*. *Artif Organs* **1995**; 19-7, pp. 603-6.

Visai L., Rindi S. *et al. In vitro Interactions of Biomedical Polyurethanes with Macrophages and Bacterial Cells*. *Journal of Biomaterials Applications* **2002**; Vol. 16, pp.191-214.

Vleggaar D. *Facial volumetric correction with injectable poly-L-lactic acid*. *Dermatol Surg* **2005**; 31:1511–1518.

Vochelle D. *The use of poly-L-lactic acid in the management of soft-tissue augmentation: a five-year experience*. *Semin Cutan Med Surg* **2004**; 23:223–226.

Wade A., Weller P.J. (Eds.). *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. American Pharmaceutical Association, Washington, DC, **1994**.

Walgenbach K-J., Voigt M., Riabikhin A.W., Andree C., Schaefer D.J., Galla T.J and Stark G.B. *Tissue Engineering in Plastic Reconstructive Surgery*. *The Anatomical Record* **2001**; 263:372-378.

Wang P.Y., Kitchens R.L., Munford R.S. *Phosphatidylinositides bind to plasma membrane CD14 and can prevent monocyte activation by bacterial lipopolysaccharide*. *J. Biol. Chem.*, **1998**; 273: 24309-24313.

Wang P.Y., Munford R.S. *CD14-dependent internalization and metabolism of extracellular phosphatidylinositol by monocytes*. *J. Biol. Chem.*, **1999**; 274: 23235-23241.

Weber C., Belge K.U., von Hundelshausen P., Draude G., Steppich B., Mack M., Frankenberger M., Weber K.S.C., Ziegler-Heitbrock H.W.L. *Differential chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulations*. J. Leukoc. Biol., **2000**; 67: 699–704.

Wells C.A., Ravasi T. & Hume D.A. *Inflammation suppressor genes: please switch out all the lights*. J Leukoc Biol **2005**; 78, 9–13.

Whitelaw D.M. *Observations on human monocyte kinetics after pulse labeling*. Cell Tissue Kinet., **1972**; 5: 311–317.

Williams D.F. *Definitions in biomaterials. Proceedings of a consensus conference of the European society of biomaterials*, Chester, England. 3-5, 1986, vol.4 New York, Elsevier, **1987**; 1420-1422.

Wynn T.A. *Fibrotic disease and the Th1/Th2 paradigm*. Nat. Rev. Immunol., **2004**; 4: 583–594.

Xia Y., Zweier J.L. *Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages*. Proc Natl Acad Sci USA **1997**;94:6954–6958.

Ye Y.Z., Strong M., Huang Z.Q., Beckman J.S. *Antibodies that recognize nitrotyrosine*. Methods Enzymol **1996**; 269:201–209.

Yu B., Hailman E. Wright S.D. *Lipopolysaccharide binding protein and soluble CD14 catalyze exchange of phospholipids*. J. Clin. Invest., **1997**; 99: 315-324.

Yue T.L., Wang X., Sung C.P. et al. *Interleukin-8. A mitogen and chemoattractant for vascular smooth muscle cells*. Circ Res **1994**;75:1-7.

Zammit D.J., Cauley L.S., Pham Q.M., Lefrancois L. *Dendritic cells maximize the memory CD8 T cell response to infection*. Immunità, **2005**; 22: 561–570.

Zdolsek J., Eaton J.W., Tang L. *Histamine release and fibrinogen adsorption mediate acute inflammatory responses to biomaterial implants in humans.* J Transl Med **2007**; 5:31.

Zdrahala R.J. and Zdrahala I.J. *Biomedical application of polyurethanes: a review of past promises, present realities and a vibrant future.* J. Biomater. Appl., **1999**; 14:67-90.

Zhu Z., Zheng T., Homer R.J., Kim Y.K., Chen N.Y., Cohn L., Hamid Q., Elias J.A. *Acidic mammalian chitinase in asthmatic Th2 inflammation and IL-13 pathway activation.* **2004**; Science, 304: 1678–1682.

Ziegler-Heitbrock H.W. *Definition of human blood monocytes.* J. Leukoc. Biol., **2000**; 67: 603–606.

Ziegler-Heitbrock H.W.L., Fingerle G., Strobel M., Schraut W., Stelter F., Schutt C., Passlick B., Pforte A. *The novel subset of CD14⁺ CD16⁺ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages.* Eur. J. Immunol., **1993**; 23: 2053–2058.

Ziegler-Heitbrock H.W.L., Ulevitch R.J. *Cell surface receptor and differentiation marker.* Immunol Today **1993**;14:121–5.