

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PAVIA



FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA, FARMACIA  
CORSO DI LAUREA SPECIALISTICA INTERFACOLTA' IN  
BIOTECNOLOGIE MEDICHE E FARMACEUTICHE

---

DIPARTIMENTO DI CHIMICA FARMACEUTICA  
Direttore: Prof.ssa Gabriella Massolini

**TESSUTO NON TESSUTO DI FIBROINA DELLA SETA  
PER L'INGEGNERIA TISSUTALE**

Relatore:

Dott.ssa Maria Luisa Torre

Correlatori:

Dott. Mario Marazzi

Dott.ssa Alessandra Boschi

Tesi Sperimentale di Laurea Specialistica in  
Biotecnologie Mediche e Farmaceutiche  
di Federico Marchesi

Anno Accademico 2009/2010

# INDICE

<b>INTRODUZIONE</b>	<b>4</b>
1. L'ingegneria dei tessuti	4
2. L'ingegneria dei tessuti e il trapianto di insule pancreatiche	12
3. La fibroina della seta come biomateriale per l'ingegneria dei tessuti	17
3.1 La biocompatibilità della fibroina	21
3.2 La biodegradabilità della fibroina	23
3.3 La sterilizzazione della fibroina	24
3.4 La fibroina della seta rigenerata	25
3.5 La fibroina della seta nativa	35
4. Tessuto non tessuto di fibroina della seta nativa come scaffold per l'ingegneria tissutale	39
<b>SCOPO DEL LAVORO</b>	<b>43</b>
<b>MATERIALI e METODI</b>	<b>45</b>
1. Disegno dello studio	45
2. Processo di produzione del SilkTNT®	45
3. Preparazione dei campioni di fibroina nativa e fibroina rigenerata utilizzati come confronto durante la caratterizzazione del SilkTNT®	47
4. Analisi del SilkTNT® mediante spettroscopia infrarossa con trasformata di Fourier (FT-IR)	48
5. Analisi del SilkTNT® mediante calorimetria differenziale a scansione modulare (DSC)	49
6. Analisi del SilkTNT® mediante microscopia ottica	50
7. Analisi del SilkTNT®, prima e dopo coltura di ADSC, mediante microscopia elettronica a scansione (SEM)	50
8. Determinazione della resistenza a trazione e dell'allungamento del SilkTNT®	52

9. Sterilizzazione del SilkTNT®	53
10. Isolamento e coltura di cellule staminali da tessuto adiposo (ADSC)	54
11. Analisi del SilkTNT® dopo coltura di ADSC mediante microscopia elettronica a trasmissione (TEM)	55
12. Isolamento e coltura di insule pancreatiche da donatore cadavere	56
<b><u>RISULTATI e DISCUSSIONE</u></b>	<b>59</b>
<b><u>CONCLUSIONI</u></b>	<b>75</b>
<b><u>BIBLIOGRAFIA</u></b>	<b>77</b>
<b><u>RINGRAZIAMENTI</u></b>	<b>91</b>

# INTRODUZIONE

## 1. L'ingegneria dei tessuti

L'ingegneria dei tessuti è stata definita come “un campo interdisciplinare che applica i principi dell'ingegneria e delle scienze della vita per lo sviluppo di sostituti biologici che ripristinino, mantengano, o migliorino la funzione di un tessuto o di un intero organo” (Langer R et al, 1993), oppure, più recentemente, come “la comprensione dei principi della crescita dei tessuti e la sua applicazione alla produzione di un tessuto di sostituzione funzionale per l'uso clinico” (MacArthur BD et al, 2005).

Dal punto di vista normativo l'ingegneria tissutale è classificata tra le terapie avanzate insieme a terapia genica e terapia cellulare somatica (Regolamento CE n. 1394/2007 del Parlamento Europeo e del Consiglio, del 13 Novembre 2007).

I progressi scientifici nel campo dei biomateriali, delle cellule staminali, dei fattori di crescita e di differenziazione hanno creato opportunità uniche per fabbricare tessuti in laboratorio attraverso la combinazione di matrici extracellulari ingegnerizzate, comunemente definite scaffold, cellule e molecole biologicamente attive.

Le cellule impiegate per realizzare un tessuto ingegnerizzato *in vitro* possono essere ottenute dallo stesso individuo in cui saranno reimpiantate; tali cellule, definite autologhe, hanno i minori problemi di rigetto e di trasmissione di agenti patogeni, ma non sono sempre disponibili. Ad esempio, soggetti affetti da malattie genetiche, anziani e individui con gravi ustioni non possiedono quantità sufficienti di cellule autologhe per stabilire linee cellulari utili all'impiego in ingegneria tissutale. Le cellule autologhe devono, inoltre, essere coltivate dalle biopsie prima di poter essere utilizzate e, per questo motivo, i prodotti che prevedono l'impiego di cellule autologhe non possono essere utilizzati in caso di terapie d'urgenza (es. grandi ustioni). Altre tipologie di cellule impiegate per l'ingegneria tissutale sono le cellule allogene, che sono ottenute dal corpo di un donatore appartenente alla stessa specie del ricevente, le cellule xenogene, che sono isolate da individui appartenenti ad una specie diversa da quella del ricevente, le cellule singene o isogene, che sono isolate da un organismo geneticamente identico all'organismo ricevente, come un gemello o un

clone, e, infine, le cellule staminali, che sono indifferenziate e possiedono la capacità di dividersi in coltura dando origine a diversi tipi di cellule specializzate. Sulla base della loro origine le cellule staminali si dividono in “adulte”, o multipotenti, ed “embrionali”, o pluripotenti; le staminali embrionali derivate da un embrione nelle prime fasi di sviluppo possiedono, invece, totipotenza.

Le cellule staminali embrionali sono in grado di dare origine a tipi cellulari di tutte le linee tissutali, ma le loro applicazioni nell'ingegneria dei tessuti sono limitate dalla mancanza di una totale comprensione e controllo della loro differenziazione verso specifiche linee tissutali *in vitro* e *in vivo*. Ci sono anche restrizioni legali e preoccupazioni di ordine etico legate al loro uso per applicazioni mediche. Al contrario, le cellule staminali adulte possono differenziare verso un numero limitato di linee cellulari tissutali ed il loro utilizzo per applicazioni cliniche è generalmente accettato, risultando una valida alternativa alle cellule staminali embrionali come fonte di cellule per l'ingegneria tissutale.

Un esempio sono le cellule staminali mesenchimali (MSCs), che possono essere isolate da un'ampia varietà di tessuti compreso il midollo osseo (Pittenger MF et al, 1999), il periostio (Fukumoto T et al, 2003), il liquido sinoviale (De Bari C et al, 2001), il muscolo (Jankowski RJ et al, 2002), il tessuto adiposo (Nathan S et al, 2003), il polmone (in't Anker PS et al, 2003), l'osso (Noth U et al, 2002), i denti decidui (Miura M et al, 2003), il derma (Young HE et al, 2001) e la cartilagine articolare (Alsalameh S et al, 2004). Le MSCs possono essere espanse e differenziare in diverse linee di tessuto connettivo tra cui l'osso, la cartilagine, il tessuto adiposo e il muscolo dopo una corretta stimolazione (Barry FP et al, 2004). Queste cellule hanno anche il potenziale per una vasta gamma di applicazioni terapeutiche attraverso il trapianto autologo, allogenico o xenogenico (Tuan RS et al, 2003). Il midollo osseo è la principale fonte di MSCs e le MSCs derivate dal midollo osseo (*Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells* - BM-MSCs) sono state utilizzate per trattare una varietà di difetti e malattie, compresi difetti ossei segmentari con dimensioni critiche, difetti della cartilagine a pieno spessore, difetti dei tendini, infarto miocardico e anche difetti nervosi (Sensebé L et al, 2010).

Sebbene le BM-MSC siano multipotenti e quindi estremamente interessanti per l'applicazione clinica, presentano problemi legati al prelievo, che richiede un'anestesia

generale o spinale, al dolore che comporta, alla scarsa resa – in media è presente una staminale ogni  $10^5$  cellule stromali aderenti (Pittinger MF et al, 1999) – e alle difficoltà nell'espansione *in vitro*.

Queste considerazioni indussero a ricercare una fonte alternativa di MSCs nel tessuto adiposo, che condivide l'origine mesodermica con il midollo. Tale tessuto, sottoforma di lipoaspirato, era utilizzato da anni in chirurgia plastica come riempitivo per correggere irregolarità dovute sia all'invecchiamento che a traumi o patologie, con buoni risultati in termini di rigenerazione tissutale (Bircoll M, 1987; Coleman SR, 1995; Fulton JE et al, 1998; Shiffman MA et al, 2001; Klinger M et al, 2008). Parallelamente diversi studi su animali dimostrarono la presenza di staminali mesenchimali in tessuti diversi dal midollo osseo (Lucas PA et al, 1993; Pate DW et al, 1993; Young HE et al, 1995; Dennis JE et al, 1999).

Nel 2001 Zuk et al. identificarono una popolazione di cellule multipotenti all'interno del lipoaspirato che analisi successive confermarono essere cellule staminali mesenchimali, in quanto esprimevano marcatori citoplasmatici e di membrana tipici delle midollari ed erano in grado di differenziare in diverse linee cellulari tra cui adipociti, osteoblasti, condrociti e miociti (Gronthos S et al, 2001; Zuk PA et al, 2001; Zuk PA et al, 2002).

Queste cellule, definite *Adipose-derived stem cells* (ADSC), possono essere ottenute, a differenza di quelle del midollo osseo, attraverso procedure mini invasive, come la microliposuzione, e in quantità superiori in quanto la resa media per grammo è di 5000 cellule per il tessuto adiposo contro 100-1000 per il tessuto midollare (Housman TS et al, 2002; Strem BM et al, 2005; Astori G et al, 2007; Faustini M et al, 2010): tali ragioni rendono sempre più il tessuto adiposo una scelta preferenziale quale fonte di cellule staminali adulte per future applicazioni cliniche.

La procedura di isolamento delle ADSC prevede una prima fase di digestione del tessuto adiposo, che consente di ottenere una popolazione di cellule eterogenea, detta frazione stromale vascolare (SVF), da cui sono poi selezionate le staminali mediante la capacità di aderire ai supporti di crescita in plastica. L'analisi dei marcatori indica che la SVF è composta da progenitori endoteliali ( $CD31^+ CD34^+ CD45^- CD90^+ CD105^{low} CD144^+ CD146^+$ ), ematopoietici ( $CD11^+ CD14^+ CD31^+ CD34^+ CD45^+ CD90^+$ ), periciti ( $CD31^- CD34^{-/+} CD45^- CD90^+ CD105^- CD146^+$ ) e da staminali mesenchimali.

Dopo la semina della frazione stromale sui supporti di crescita, le ADSC, che esprimono marcatori stromali, come CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166, e marcatori staminali, come ABCG2 e ALDH, diventano la popolazione dominante con un quantitativo dell'80% nei primi giorni di coltura fino ad essere il 95% al primo passaggio (Sengenès C et al, 2005; Mitchell JB et al, 2006; Yoshimura K et al, 2006; Astori G et al, 2007; Varma MJ et al, 2007; Peroni D et al, 2008); in Tabella 1 sono elencati i principali marcatori delle ADSC.

Tabella 1: Principali marcatori delle ADSC.

<i><b>Marcatori</b></i>	<i><b>Descrizione</b></i>
CD9	Precursori mesenchimali
CD10	Precursori mesenchimali
CD13	Aminopeptidasi
CD29	Recettore fibronectina
CD44	Recettore acido ialuronico
CD49	Recettore per componenti della membrana extracellulare
CD54	integrina ICAM1 per la migrazione cellulare
CD59	Integrina
CD63	Sviluppo, crescita e mobilità cellulare tipico delle MSC
CD73	Migrazione e adesione cellulare tipico delle MSC
CD90	Interazioni intercellulari e cellula-matrice extracellulare
CD105	Recettore di TGF $\beta$
CD106	Molecola di adesione VCAM1
CD146	Molecola di adesione
CD166	Molecola di adesione
HLA-I	Complesso maggiore di istocompatibilità di classe I
ABCG2	Marcatore staminale
ALDH	Marcatore staminale

Un altro aspetto chiave delle ADSC è la loro capacità di esprimere un numero molto elevato di proteine che nell'insieme viene definito "proteoma"; le più importanti sono elencate in Tabella 2 (Delany J et al, 2005; Zvonic S et al, 2007; Kim WS et al, 2007).

Tabella 2: Proteine espresse dalle ADSC.

<i>Proteine</i>	<i>Descrizione</i>
FGF-7	Sottotipo di <i>Fibroblast Growth Factor</i> , secreto da cellule stromali e con effetto mitogeno sulle cellule epiteliali
FGF-2	Sottotipo di <i>Fibroblast Growth Factor</i> secreto da cellule mesenchimali durante la riparazione tessutale e con effetto sulla sintesi proteica di cheratinociti, fibroblasti e azione chemiotattica sulle cellule endoteliali
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i> con ruolo nell'angiogenesi
TGF $\beta$ 1/ $\beta$ 2	Isoforme del <i>transforming growth factor</i> con azione stimolatoria sulle cellule di origine mesenchimale
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i> coinvolto nell'angiogenesi
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> coinvolto nell'angiogenesi
IGF bp-3	<i>Insulin-like growth factor binding protein-3</i> coinvolto nell'angiogenesi
IL-6	Interleuchina che stimola linfociti T e B, fibroblasti e cheratinociti
IL-8	Interleuchina con azione chemiotattica sui cheratinociti
LAMININA	Componente matrice extracellulare
COLLAGENE I e VI	Componente dello strato reticolare del derma e della membrana basale
VIMENTINA	Principale filamento intermedio del citoscheletro delle cellule mesenchimali
FIBRONECTINA	Coinvolta nel processo di cicatrizzazione e formazione della matrice extracellulare

Nel 2008, Sugiyama et al. valutarono la possibilità di utilizzare le ADSC come substrato nutritivo (*feeder layer*) per il sostegno della crescita di cheratinociti, di cellule del limbus corneale e dell'epitelio orale. Le ADSC, irradiate alla dose di 20 Gy per evitare la loro trasformazione tumorale e poste in co-coltura con i diversi tipi cellulari, si dimostrarono in grado di sostenere l'adesione e la crescita iniziale (Sugiyama et al, 2008).

L'utilizzo di ADSC come *feeder layer* nel campo dell'ingegneria tissutale potrebbe rappresentare, quindi, una buona strategia per facilitare l'attecchimento delle cellule ai supporti tridimensionali per la crescita, favorire la corretta rigenerazione di un tessuto e ridurre il rischio di rigetto post-impianto.

I supporti artificiali impiegati in ingegneria tissutale per coltivare le cellule, generalmente denominati scaffold, devono essere in grado di sostenere la formazione di un tessuto tridimensionale. Idealmente, uno scaffold deve: fornire un supporto per l'adesione, la migrazione, le interazioni cellula-cellula, la proliferazione e la differenziazione cellulare; essere biocompatibile per il sistema immunitario dell'ospite

dove il tessuto ingegnerizzato sarà impiantato; biodegradarsi ad una velocità compatibile con il tasso di crescita del nuovo tessuto e che faciliti l'integrazione dello stesso nel tessuto ospite circostante; fornire un sostegno strutturale per il nuovo tessuto; possedere versatilità di realizzazione che permetta di alterarne la struttura e la morfologia in relazione alle esigenze specifiche del tessuto (Wang Y et al, 2006 (a)).

Diversi materiali, naturali e sintetici, biodegradabili e permanenti, sono stati studiati per la produzione di scaffold (Tabella 3).

Tabella 3: Materiali polimerici usati nell'ingegneria tissutale e tessuti bersaglio (da Wang Y et al, 2006 (a), modificato).

<i>Materiali polimerici</i>	<i>Tessuti bersaglio</i>
Collagene nativo/denaturato e copolimeri contenenti collagene	Pelle, osso, cartilagine, tendini, legamenti, polmoni, nervi
Polisaccaridi (alginato, chitosano, ialuronato)	Pelle, cartilagine, tendini, legamenti
Fibroina della seta nativa	Legamenti
Fibroina della seta rigenerata	Pelle, ossa, cartilagine
Acido poliglicolico (PGA), acido polilattico (PLA) e loro copolimeri (PLGA)	Pelle, osso, cartilagine, tendini, legamenti, nervi
Poli( $\epsilon$ -caprolattone) (PCL) e suoi compositi	Pelle, osso, cartilagine, tendini
Poliidrossialcanoati (PHA) e compositi	Pelle, osso, cartilagine, tendini
Policarbonati derivati dalla tirosina	Osso
Polipropilene fumarato (PPF)	Osso
Poliglicerolo sebacato	Ricostruzione neurale
Polifosfoestere	Osso, nervi
Polifosfazene e suoi compositi	Osso

La maggior parte di questi materiali era nota nell'ambito biomedicale ben prima dello sviluppo delle terapie avanzate; esempi sono il collagene e alcuni poliesteri che venivano impiegati come punti di sutura riassorbibili.

I materiali naturali esplorati con successo per la coltura tridimensionale di cellule includono collagene, fibrina e amido (Salgado AJ et al, 2006), scaffold di gelatina-condroitin solfato (Yang SH et al, 2005), cellulosa-acido ialuronico reticolati (Sannino

A et al, 2004) e collagene-glicosaminoglicani (GAG) (Yannas IV et al, 1989). Idrogeli di alginato sono stati utilizzati per l'ingegneria dei tessuti ossei (Alsberg E et al, 2001). Polimeri sintetici come polipeptidi (Zhang S, 2003; Hartgerink JD et al, 2002), acido polilattico (PLA) (Liua X et al, 2006), acido poliglicolico (PGA), poli- $\epsilon$ -caprolattone (PCL) e miscele di poli(lattide-*co*-glicolide) (Jabbarzadeh E et al, 2007), poli(glicolide-*co*-caprolattone) (Lee SH et al, 2003) sono stati studiati come potenziali materiali per l'ingegneria dei tessuti. L'acido polilattico da solo o in combinazione con gelatina è stato utilizzato anche per allestire scaffold microporosi per colture cellulari (Salgado AJ et al, 2006). Anche idrogeli fotopolimerizzati (Nguyen KT e West JL, 2002), termo-reversibili (Park KH et al, 2005), scaffold di polilattide-chitosano (Wan Y et al, 2006) e scaffold fibrosi nano-strutturati progettati per auto-assemblaggio indotto da pH di peptidi anfifilici (Stupp SI et al, 1997) sono stati studiati per le applicazioni in ingegneria tissutale. (Langer R e Tirrell D, 2004; Goldberg M et al, 2007).

Diversi metodi sono stati descritti in letteratura per la preparazione di strutture porose da impiegare come scaffold nell'ingegneria dei tessuti.

La metodica di evaporazione del solvente e dissoluzione del particolato (*Solvent Casting & Particulate Leaching* - SCPL) consente la preparazione di strutture porose con dimensione dei pori regolare. Tale tecnica è basata sulla dispersione di particelle di un agente porogeno, come cloruro di sodio, cristalli di saccarosio, sfere di gelatina o sfere di paraffina, in una soluzione di polimero. La dimensione delle particelle di agente porogeno avrà effetto sulla dimensione dei pori dello scaffold. Dopo la completa evaporazione del solvente, la struttura composta formatasi è immersa in un bagno di liquido adatto per la dissoluzione del porogeno: acqua in caso di cloruro di sodio, saccarosio e gelatina o un solvente alifatico come l'esano nel caso di paraffina. Una volta che il porogeno è stato completamente disciolto, si ottiene una struttura porosa. I vantaggi di questa tecnica includono la semplicità, la versatilità e la facilità di controllo della dimensione e della geometria dei pori. Uno svantaggio consiste nella difficoltà di produrre un'accurata interconnettività tra i pori e nell'uso di solventi organici, che devono essere completamente rimossi al fine di evitare ogni possibile danno alle cellule seminate sullo scaffold (Hou QP et al, 2003; Lee SH et al, 2003; Moore MJ et al, 2004).

La schiumatura con gas (*gas foaming*) è un'altra tecnica che, attraverso l'utilizzo di un gas (solitamente CO<sub>2</sub>) come agente porogeno, supera le necessità di utilizzare solventi organici e porogeni solidi. In primo luogo, dischi del polimero desiderato sono preparati per mezzo di compressione a caldo. I dischi vengono poi posti in una camera dove sono esposti a CO<sub>2</sub> ad alta pressione per diversi giorni. Una rapida riduzione della pressione all'interno della camera produce instabilità termodinamica con conseguente nucleazione e formazione dei pori. I principali problemi di questa tecnica sono causati dal calore eccessivo utilizzato durante la compressione a caldo - che vieta l'inserimento di qualsiasi materiale temperatura labile nella matrice polimerica - e dal fatto che i pori non formano una struttura interconnessa (Harris LD et al, 1998; Mathieu LM et al, 2006).

Anche la metodica di emulsificazione/liofilizzazione non richiede l'uso di porogeni solidi. In tale tecnica un polimero sintetico viene disciolto in un solvente adatto, poi alla soluzione polimerica viene aggiunta acqua; i due liquidi sono mescolati in modo da ottenere un'emulsione. Prima che le due fasi si separino, l'emulsione viene colata in uno stampo e rapidamente congelata mediante immersione in azoto liquido. L'emulsione congelata viene in seguito liofilizzata per rimuovere l'acqua dispersa e il solvente, lasciando così una struttura polimerica solida porosa. Nonostante l'emulsificazione/liofilizzazione consenta la preparazione di scaffold in modo più veloce rispetto alla tecnica SCPL, l'uso dei solventi ne rappresenta uno svantaggio. Inoltre, la dimensione dei pori è relativamente piccola e la porosità è spesso irregolare. Anche la sola liofilizzazione è una tecnica comunemente impiegata nella realizzazione di scaffold come, ad esempio, spugne di collagene (Liapis AI et al, 1996).

La separazione di fase termicamente indotta (*Thermally Induced Phase Separation - TIPS*) è una tecnica che sfrutta il decremento di solubilità del polimero in soluzione associato ad un aumento di temperatura. Una volta che la separazione è indotta, il solvente è rimosso attraverso estrazione, evaporazione o liofilizzazione (vandeWitte P et al, 1996; Yang F et al, 2004)

Una metodica molto versatile, che può essere usata per produrre membrane polimeriche non-tessute con fibre del diametro di pochi nanometri, è l'elettrofilatura (*electrospinning*). Il processo è controllato da un campo elettrico ad alta intensità prodotto tra due elettrodi di carica opposta. Un elettrodo è posto nella soluzione

polimerica, mentre l'altro in un collettore. La soluzione polimerica è pompata all'esterno attraverso un ugello che forma gocce di soluzione polimerica. Quando il campo elettrico produce una forza nella goccia che supera la tensione superficiale della soluzione, un getto di polimero viene espulso producendo le fibre. Il solvente comincia ad evaporare nell'istante di formazione del getto e continua dopo la deposizione delle nano-fibre nel collettore. Le caratteristiche delle nano-fibre e delle maglie sono in relazione alle proprietà della soluzione e ai parametri di processo (Reneker DH et al, 1996; Li D et al, 2004)

Anche metodologie che derivano dal settore tessile sono state impiegate con successo per la preparazione di maglie non-tessute di diversi polimeri. In particolare, strutture non-tessute di acido poliglicolico sono state testate per applicazioni in ingegneria dei tessuti dimostrandosi utili per la crescita di diversi tipi di cellule quali, ad esempio, i condrociti nella ricostruzione della cartilagine (Rotter N et al, 1998).

## **2. L'ingegneria dei tessuti e il trapianto di insule pancreatiche**

Il diabete è una patologia assai grave con un altissimo impatto sia in termini di vite umane che di costi socio-sanitari. Il Diabete di tipo 1 (T1D) è caratterizzato da una progressiva distruzione su base autoimmune delle cellule pancreatiche che producono insulina ( $\beta$ -cellule) e che comporta un'insufficiente secrezione insulinica. Un adeguato controllo glicemico è raccomandato nei pazienti affetti dal T1D al fine di prevenire o ritardare le complicanze associate all'iperglicemia. Terapie basate su trattamenti insulinici intensivi consentono di ottenere un sostanziale miglioramento dei valori di emoglobina glicata (A1c) e sono inoltre utili nel limitare la progressione delle complicanze micro- e macro-vascolari legate a tale patologia. Purtroppo, la terapia insulinica intensiva non è in grado di controllare i livelli glicemici durante l'arco dell'intera giornata ed espone al rischio di gravi ipoglicemie che possono essere a volte fatali. Il trapianto allogenico di insule pancreatiche può ripristinare con successo la funzionalità  $\beta$ -cellulare rendendo i pazienti affetti da T1D normoglicemici. Negli ultimi anni, i continui progressi in questo campo hanno consentito di aumentare il numero di trapianti di insule pancreatiche effettuati in tali pazienti e i risultati dei più

recenti *trials* clinici sono molto incoraggianti (Ricordi C et al, 2007).

Le insule pancreatiche, denominate anche isole di Langerhans, sono agglomerati di cellule endocrine che costituiscono circa l'1% del tessuto pancreatico dove svolgono una funzione di sensori dei valori glicemici secernendo gli ormoni che ne regolano l'omeostasi. Le insule destinate al trapianto vengono ottenute mediante una procedura di isolamento che consiste nella digestione meccanica ed enzimatica combinata del tessuto pancreatico seguita da una fase di purificazione su gradienti con differenti densità. La possibilità di mantenere le insule in coltura prima di eseguire il trapianto offre una serie di opportunità terapeutiche mirate a migliorare l'efficienza e la sopravvivenza del trapianto stesso; inoltre, il trapianto viene eseguito utilizzando una tecnica assai più semplice di quella necessaria per il trapianto di pancreas vascolarizzato. La procedura di trapianto consiste, infatti, in una cannulazione della vena porta per via percutanea transepatica eseguita mediante tecniche di radiologica interventistica mininvasiva sotto guida ecografica e radioscopica in paziente cosciente e sedato; attraverso tale cannulazione le insule vengono infuse nel circolo portale e quindi nel fegato. Tale procedura è associata ad una bassa morbilità ed inoltre consente di essere ripetuta al fine di infondere un'ulteriore dose di insule qualora fosse necessario per raggiungere un adeguato controllo metabolico e l'indipendenza insulinica.

Il trapianto allogenico di insule è generalmente indicato nei pazienti affetti da T1D scompensato ed associato ad episodi gravi di ipoglicemia con progressione delle complicanze legate al diabete. I pazienti affetti da diabete con insufficienza renale terminale possono ricevere un trapianto combinato di rene ed insule pancreatiche simultaneamente (SIK) oppure un trapianto di insule dopo il trapianto di rene (IAK). L'obiettivo del trapianto di insule è quello di controllare la glicemia ripristinando la funzione  $\beta$ -cellulare. Lo stretto controllo dei valori glicemici ottenuto somministrando terapia insulinica intensiva ha dimostrato grandi benefici nel prevenire o ritardare la progressione delle complicanze croniche micro e macro-vascolari del diabete, ma tali benefici sono associati ad un aumentato rischio di ipoglicemie acute gravi. Il trapianto di insule rappresenta una valida opzione terapeutica per migliorare il controllo metabolico senza incorrere nel rischio di ipoglicemie severe. Subito dopo l'infusione delle insule si assiste ad una importante riduzione del fabbisogno insulinico giornaliero

che si accompagna ad un miglioramento del controllo glicemico (Ricordi C et al, 2007).

L'insulino-indipendenza è generalmente ottenuta dopo il trapianto di un numero sufficiente di insule (>13.000 insule/Kg di peso corporeo del ricevente) in una singola infusione oppure ricorrendo ad infusioni ripetute. Recenti studi clinici hanno riportato l'ottenimento di insulino-indipendenza in tutti i pazienti che avevano completato il protocollo di trapianto sequenziale di insule al fine di raggiungere una massa di insule sufficiente. In questi casi, l'80% dei pazienti manteneva l'insulino-indipendenza ad un anno dal trapianto. Il controllo metabolico nei pazienti sottoposti a trapianto di insule risulta estremamente migliorato se paragonato al periodo precedente al trapianto.

In tutti gli studi clinici la valutazione dei benefici psicologici di nuovi protocolli terapeutici richiede sempre grande attenzione; in particolare, è stato rilevato un evidente miglioramento nella qualità della vita dei pazienti durante il *follow up* e sono stati messi in evidenza gli effetti positivi legati al senso di indipendenza dalla terapia insulinica e all'assenza di crisi ipoglicemiche gravi. Gli effetti del trapianto di insule sulla progressione delle complicanze del diabete sono attualmente oggetto di studio. La mancanza di studi randomizzati limita attualmente la possibilità di generalizzare i risultati ottenuti in studi eseguiti su campioni limitati di pazienti, sebbene le osservazioni iniziali appaiano alquanto promettenti (Ricordi C et al, 2007).

I risultati riportati nel campo del trapianto di insule negli ultimi anni sono la conseguenza di continui miglioramenti nelle metodiche di ottenimento delle insule pancreatiche e nella gestione dei pazienti trapiantati. Tuttavia molte problematiche devono ancora essere affrontate e superate al fine di allargare le indicazioni di questa opzione terapeutica ad un più ampio numero di pazienti che potrebbero trarne beneficio. Al fine di raggiungere l'insulino-indipendenza esiste l'esigenza di trapiantare un numero sufficiente di insule che generalmente è ottenuto da più di un pancreas; il successo della terapia dipende dalla possibilità di preservare la massa insulare funzionale durante tutte le fasi che precedono e seguono il trapianto: preservazione fredda, procedure di isolamento, trapianto e *follow up* post-trapianto. Anche quando un adeguato numero di insule è disponibile per il trapianto, è assolutamente cruciale utilizzare strategie che possano conferire citoprotezione al preparato cellulare in combinazione con altre capaci di indurre sopravvivenza a lungo

termine mediante immunomodulazione. Solamente con un approccio sequenziale ed integrato sarà possibile prevenire la perdita delle insule e migliorare l'esito finale del trapianto.

Lo scarso numero di pancreas disponibili per il trapianto rappresenta il primo fattore limitante in questo campo. Le procedure di isolamento e coltura delle insule rappresentano un'altra fase critica in grado di influenzare il numero e la qualità; il miglioramento e la standardizzazione di tali procedure sono necessarie per massimizzare l'efficacia e migliorare la qualità del preparato destinato al trapianto. La stessa procedura di trapianto intraepatico contribuisce alla perdita di una cospicua massa di insule. E' stato stimato che circa il 60% delle insule impiantate va incontro a morte cellulare subito dopo l'infusione intraportale, anche in assenza di una risposta immunitaria specifica; ciò suggerisce che a determinare questo fenomeno possa contribuire una risposta infiammatoria aspecifica. Infatti, una risposta infiammatoria istantanea mediata dal contatto tra insule e sangue avrebbe luogo al momento dell'infusione nel sistema portale del ricevente che coinvolgerebbe l'attivazione della cascata coagulativa e del complemento. Questa serie di fenomeni infiammatori può essere amplificata dalle insule stesse che sono in grado di produrre mediatori dell'infiammazione in risposta a condizioni di stress. Inoltre le insule non sono immediatamente vascolarizzate e perciò sono esposte a condizioni di ipossia che possono avere un effetto dannoso sulle cellule insulari e portare ad una perdita di massa funzionale o al mancato attecchimento. Notevoli progressi sono stati fatti per quanto riguarda l'utilizzo di nuove molecole in grado di conferire citoprotezione sempre nell'ottica di prevenire la perdita di insule e preservarne il più possibile la funzionalità. L'inibizione di protein chinasi inducibili dallo stress (come p38, c-Jun e nuclear factor-kB) rappresenta un'affascinante possibilità di sviluppo nell'ambito della citoprotezione. In tal senso, infatti, la modulazione della risposta infiammatoria al momento del trapianto potrebbe essere cruciale per ridurre la perdita di funzione e di massa cellulare e permettere l'ottenimento di insulino-indipendenza utilizzando una singola infusione in maniera più riproducibile (Ricordi C et al, 2007).

Gli studi clinici attualmente in corso stanno dimostrando che una progressiva perdita della funzionalità delle insule avviene dopo il trapianto ed è responsabile della reintroduzione della terapia insulinica al fine di mantenere un soddisfacente controllo

metabolico. E' ipotizzabile che molteplici fattori siano responsabili di tale fenomeno. E' noto che i farmaci immunosoppressivi utilizzati per il trattamento di pazienti trapiantati siano tossici nei confronti delle  $\beta$ -cellule; la scelta del trattamento immunosoppressivo è, quindi, assolutamente cruciale al fine di raggiungere una sopravvivenza a lungo termine del trapianto. Lo sviluppo di terapie immunomodulatorie sicure, efficaci e non tossiche per le insule, capaci di indurre tolleranza nei confronti del tessuto trapiantato, senza bisogno di una immunosoppressione cronica, rappresentano l'obiettivo finale in questo ambito. Numerosi approcci sperimentali che utilizzano agenti immunomodulatori e cellule staminali mesenchimali derivate dal midollo osseo del donatore si stanno rivelando interessanti nell'indurre tolleranza immunologica.

Attualmente sono oggetto di studio siti alternativi per il trapianto di insule, che possano offrire un ambiente più sicuro e meno tossico per le cellule trapiantate, e molecole che riducano la componente infiammatoria nel sito di impianto. Particolarmente promettente appare l'introduzione di sistemi biocompatibili totalmente impiantabili, in grado di ospitare e proteggere le insule trapiantate, e di tasche omentali che potrebbero essere utili nel superare alcuni limiti all'attuale procedura intraepatica (Ricordi C et al, 2007).

In recenti studi su modello murino, effettuati al Diabetes Research Institute di Miami (Florida - USA), un piccolo cilindro a maglia (BioHybrid®) è stato impiantato nel sottocute e si è lasciato che una rete di vasi sanguigni crescesse al suo interno e intorno alla maglia. A seguito di vascolarizzazione adeguata le cellule insulari sono state inserite nel cilindro e la rete di vasi sanguigni è stata in grado di fornire immediatamente ossigeno e altre sostanze nutrienti vitali alle cellule. Questo dispositivo impiantabile offre un ambiente ottimale all'interno del quale le insule trapiantate possono essere protette e sopravvivere. Inoltre, la soluzione BioHybrid® fornisce un altro vantaggio: attualmente, il trapianto di insule pancreatiche è accompagnato da una potente immunosoppressione sistemica cronica; i farmaci immunosoppressori sono spesso causa di effetti collaterali indesiderati, compresi i danni alle stesse cellule insulari, ed indeboliscono il sistema immunitario del ricevente che diventa suscettibile a qualsiasi tipo di infezione. Al contrario, questo dispositivo sintetico, contenente le insule trapiantate, ha consentito la somministrazione di

immunosoppressori nel modello murino a livello locale, permettendo una riduzione di cento volte della dose di farmaco immunosoppressore normalmente somministrata per via sistemica e una minimizzazione degli effetti collaterali per il ricevente (Pileggi A et al, 2006; Marzorati S et al, 2009; Buchwald P et al, 2010).

L'inserimento delle insule all'interno del dispositivo medico BioHybrid® potrebbe essere ottimizzato attraverso l'ancoraggio delle stesse ad uno scaffold polimerico. Il compito dello scaffold dovrebbe essere quello di fornire alle insule una struttura tridimensionale che consenta alle stesse di non ammassarsi e di distribuirsi uniformemente in tutto lo spazio disponibile, in maniera simile alla loro disposizione all'interno del pancreas nativo, e che permetta, quindi, ad ossigeno e sostanze nutritive di raggiungere anche le insule che si trovano ancorate nelle zone più interne.

### **3. La fibroina della seta come biomateriale per l'ingegneria dei tessuti**

La seta è un materiale proteico prodotto da differenti specie di artropodi. Quella comunemente conosciuta proviene da un insetto, *Bombyx Mori*, tradizionalmente denominato baco da seta, ma sono facilmente reperibili sete provenienti da decine di altri lepidotti ed aracnidi.

L'impiego di tale fibra è stato tradizionalmente indirizzato al campo tessile, ma nel corso degli ultimi anni molti sono gli impieghi di tipo tecnico e fra questi alcuni riguardano il settore biomedicale.

La seta prima di essere una fibra tessile è un biomateriale, composto da due molecole proteiche, fibroina e sericina, prodotte da ghiandole specializzate dislocate ai lati dell'apparato digerente delle larve. Esse hanno funzione secretrice e nello stesso tempo di serbatoio fino al momento dell'estrusione e quindi della trasformazione della seta liquida in fibra solida e cristallina.

La seta naturale, nella forma di filamento, è composta da due bavelle continue di fibroina, proteina strutturale ad alto peso molecolare (350 kDa) insolubile in acqua che ne costituisce il 72-81%, avvolte e tenute insieme da un rivestimento di sericina, proteina non strutturale, appartenente ad una famiglia di proteine idrofile dette “glue-

like”, che ne costituisce il 19-28% (Zhou CZ et al, 2000; Acharya C et al, 2009; Cao Y et al, 2009) (Fig. 1).

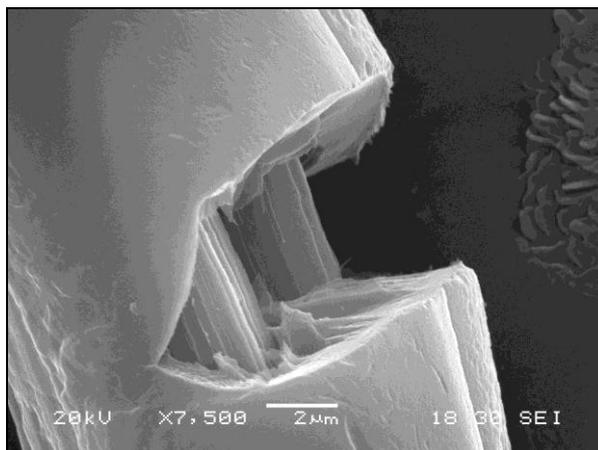


Fig. 1: Fotografia al microscopio elettronico di una fibra di seta in cui sono mostrate le due bavelle di fibroina ed il loro rivestimento di sericina.

L'utilizzo della seta in campo biomedicale può avvenire soltanto in seguito alla rimozione della sericina, causa degli effetti di ipersensibilità e immunogenicità scatenati dalla fibra di seta tal quale. L'allontanamento della sericina avviene mediante il processo di sgommatura (Altman GH et al, 2003) che consiste nel posizionamento dei bozzoli in autoclave a 120°C per un'ora e nel successivo lavaggio ripetuto degli stessi in acqua deionizzata a 65°C. Si ottengono in tal modo fibre costituite dall'aggregazione di molecole di fibroina, legate tra loro da una fitta rete di legami idrogeno intermolecolari.

Sulla base di evidenze di tipo chimico, quali la sequenza amminoacidica, e di tipo strutturale, ottenute mediante diffrazione a raggi X, la conformazione della fibroina è stata ricondotta ad una predominante struttura a foglietto  $\beta$  ( $\beta$ -sheet) antiparallelo (Fig. 2), denominata *silk II*, prodotta dalla ripetizione per lunghi tratti della molecola di un'unità cristallina caratterizzata dai residui amminoacidici glicina (Gly), alanina (Ala) e serina (Ser), che coesiste con minoritarie strutture amorfe (*random coil*,  $\alpha$ -elica e  $\beta$ -turn), definite *silk I*, prodotte da sequenze amminoacidiche più complesse contenenti treonina e amminoacidi con gruppi laterali ingombranti e carichi (Lucas F et al, 1958). La fibroina esiste, quindi, in due conformazioni: *silk II*, stabile e insolubile in acqua, e *silk I*, metastabile e solubile in acqua; entrambe le conformazioni sono sempre

presenti, ma con la forte predominanza della componente cristallina su quella amorfa. (Chen X et al, 2001; Lawrence BD et al, 2008).

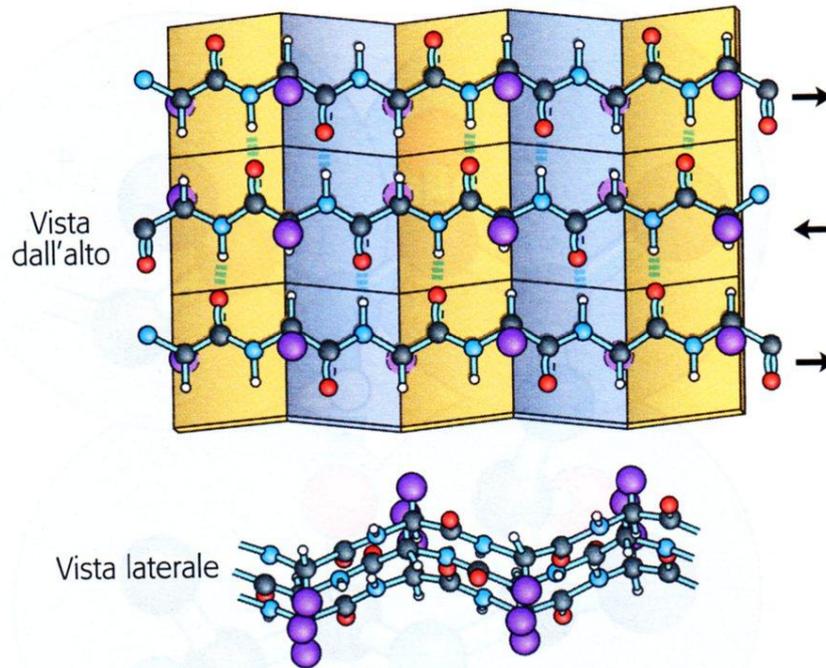


Fig. 2: Struttura a  $\beta$ -sheet antiparallelo della fibroina (da “I principi di biochimica di Lehninger” di Nelson DL e Cox MM – ed. Zanichelli 2006)

Per la caratterizzazione della fibroina e la determinazione della sua struttura secondaria è comunemente utilizzata la tecnica spettroscopica FT-IR (spettroscopia infrarossa con trasformata di Fourier), di facile impiego ed elevata sensibilità.

Proteine e polipeptidi, analizzati con questa tecnica, mostrano nove bande di assorbimento principali che vengono denominate come ammidi A, B, I, II, III, IV, V, VI e VII. Le più significative ai fini del riconoscimento sono l’ammide I e l’ammide II. La banda di assorbimento relativa all’ammide I, osservabile nella regione dello spettro elettromagnetico compresa tra  $1600\text{ cm}^{-1}$  e  $1700\text{ cm}^{-1}$ , è determinata interamente dallo *stretching* del gruppo carbonilico (C=O). L’ammide II è caratterizzata da una banda di assorbimento nella regione compresa tra  $1480\text{ cm}^{-1}$  e  $1575\text{ cm}^{-1}$  ed è dovuta al *bending* in piano del gruppo N-H e allo *stretching* del gruppo C-N (Um IC et al, 2001; Vasconcelos A et al, 2008).

La correlazione tra la posizione della banda ed il tipo di struttura secondaria della proteina è nota da tempo; l’assorbimento di maggior rilievo è quello dell’ammide I, poiché meno condizionato dalle influenze esterne, e per il quale si riscontrano bande di

assorbimento nella regione intorno a  $1620\text{ cm}^{-1}$  nel caso della conformazione  $\beta$ -sheet e nella regione intorno a  $1644\text{ cm}^{-1}$  per la conformazione ad  $\alpha$ -elica.

Nel caso della fibroina, in cui la conformazione ordinata  $\beta$ -sheet coesiste con strutture a minor cristallinità ( $\alpha$ -elica,  $\beta$ -turn e *random coil*), ciascuna conformazione fornisce un contributo in termini di assorbimento ed il risultato finale consiste in una banda di assorbimento, relativa all'ammide I, estremamente ampia (Hu X et al, 2006).

Lo studio delle proprietà fisiche e della struttura della fibroina può essere effettuato anche per mezzo di una tecnica termoanalitica, denominata calorimetria differenziale a scansione (DSC), solitamente utilizzata per studiare le transizioni termiche di materiali polimerici.

Nella DSC le temperature del campione e di un riferimento inerte, cioè che non subisce alcuna variazione durante il processo, sono misurate e controllate rispetto a un programma di variazione delle temperature in funzione del tempo.

Nella DSC a flusso di calore (*heat flow DSC*) un crogiolo contenente il campione e un crogiolo vuoto di riferimento vengono posti, all'interno della camera di misura, su una lastra sensibile, caratterizzata da una resistenza nota, che determina il flusso di calore; si instaura, così, una differenza di temperatura ( $\Delta T$ ) fra i due crogioli dovuta alle differenti capacità e conducibilità termiche del campione e del riferimento.

Le curve che si ottengono, denominate termogrammi, riflettono le variazioni energetiche del polimero che risultano da variazioni della sua struttura.

L'analisi DSC di fibroina nativa, che presenta una predominante conformazione a foglietto  $\beta$  antiparallelo, produce termogrammi con un primo picco piuttosto allargato, di natura endotermica, posizionato intorno ai  $100^\circ\text{C}$ , attribuito all'evaporazione dell'acqua assorbita dalle fibre, e un secondo picco, anch'esso di natura endotermica, posizionato oltre i  $300^\circ\text{C}$ , ascritto ad un processo di distruzione, indotto dalla temperatura, dell'impacchettamento delle macromolecole di fibroina disposte a foglietto  $\beta$  antiparallelo.

L'analisi DSC di fibroina che ha subito un processo di solubilizzazione e di successiva rigenerazione chimica produce, invece, termogrammi differenti per la presenza di una maggior percentuale di strutture amorfe; si distingue ancora il picco endotermico intorno ai  $100^\circ\text{C}$ , attribuito all'evaporazione dell'acqua, ma il picco endotermico, attribuito alla degradazione della proteina, risulta posizionato ad una temperatura

inferiore (~280°C). Sono presenti, inoltre, uno *shift* endotermico intorno ai 175°C, attribuito alla transizione vetrosa della fibroina, e un picco esotermico intorno ai 210°C, prodotto dalla cristallizzazione della proteina (Magoshi J et al, 1975).

Nel corso degli ultimi dieci anni l'interesse del mondo scientifico nei confronti della fibroina è cresciuto enormemente e le motivazioni sono da ricercare nelle sue particolari proprietà: le eccellenti proprietà meccaniche, la sua biocompatibilità e biodegradabilità, la buona resistenza alla contaminazione microbica e la relativa stabilità ambientale rispetto alle proteine globulari, grazie all'ampia presenza di legami idrogeno e alla significativa percentuale di domini cristallini, rendono la fibroina un candidato ideale per l'impiego nel campo dell'ingegneria tissutale e nello studio di sistemi a rilascio controllato di farmaci (Altman GH et al, 2003; Leal-Egaña A et al, 2010).

Le qualità della fibroina prodotta dal *B. mori* l'hanno resa per decenni il materiale costitutivo per eccellenza dei fili di sutura. Oggi la fibroina serica può essere processata nella sua forma nativa, attraverso tecnologie di derivazione tessile, in fili da sutura, scaffold per colture cellulari e substrati per il bendaggio e il trattamento di patologie ulcerative e lesioni cutanee. E' inoltre possibile, attraverso un processo prettamente chimico di solubilizzazione, rigenerare la fibroina in scaffold con differenti morfologie, quali film, membrane, idrogeli e spugne, in composizione pura o in miscele con altri polimeri e sostanze attive sinergiche, da utilizzare per la coltura di differenti tipi di cellule.

### 3.1 *La biocompatibilità della fibroina*

Con il termine biocompatibilità si intende il complesso delle interazioni che si instaurano tra organismo vivente e dispositivo biomedicale; quest'ultimo deve interagire con i tessuti dell'organismo ospite senza provocare reazioni avverse che potrebbero interferire con lo scopo terapeutico (Freddi G, 2008).

La fibroina può essere considerata a tutti gli effetti un polimero biocompatibile, a pari livello con i migliori polimeri sintetici attualmente impiegati come biomateriali: in particolare Minoura et al. osservarono che la fibroina favorisce l'adesione delle cellule alla sua superficie promuovendone la crescita; inoltre, la fibroina non induce effetti

trombogenici significativi e le membrane derivate da essa si sono dimostrate permeabili all'ossigeno e al vapore acqueo (Minoura N et al, 1990 (a,b)).

Il potenziale infiammatorio della fibroina è stato per lungo tempo sospettato: mettendo a contatto membrane di fibroina con elementi proteici e cellulari implicati nella regolazione della risposta infiammatoria, Santin et al. nel 1999 studiarono l'attivazione del frammento C3 del sistema del complemento, il grado di adsorbimento delle proteine del plasma sulla superficie della membrana, la forza di legame del frammento C3, l'attivazione delle cellule mononucleari e l'adesione delle cellule del sistema infiammatorio. Come confronto furono utilizzati due polimeri modello, il polistirene ed il poliidrossietilmetacrilato, con proprietà fisico-chimiche completamente diverse e che trovano largo impiego nel campo dei biomateriali. Venne dimostrato che la fibroina lega minori quantità di fibrinogeno rispetto agli altri due polimeri, mentre non furono riscontrate differenze nel livello di adsorbimento del frammento C3 del complemento e delle immunoglobuline IgG. L'attivazione delle cellule mononucleari indotta dalla fibroina, valutata sulla base della produzione di interleuchina 1  $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), risultava inferiore rispetto a quella indotta dai due polimeri di riferimento. Per quanto riguarda l'adesione cellulare, fu evidenziata la capacità dei macrofagi di aderire alla superficie della membrana di fibroina, senza però raggiungere un elevato grado di diffusione. I risultati ottenuti confermarono, quindi, che l'interazione della fibroina con i diversi componenti del sistema infiammatorio era simile a quella dei due polimeri modello, al contrario del grado di attivazione e adesione indotto sulle cellule immunocompetenti che risultava inferiore (Santin M et al, 1999).

Le infiammazioni riscontrate in seguito all'uso di fili di sutura in seta venne attribuito alla non preventiva rimozione della sericina: la rimozione di quest'ultima produceva una risposta biologica dell'organismo alla fibroina del tutto simile a quella prodotta dagli altri biomateriali di uso comune e dipendente principalmente dal sito di impianto, dalla grandezza e dalla geometria del biomateriale (Altman GH et al, 2003).

Wen et al. nel 1990 documentarono la responsabilità della sericina nell'insorgenza di reazioni immunologiche: essi constatarono, infatti, che l'estratto di sericina era responsabile della risposta allergica di tipo I, asma e sovra-regolazione delle IgE (Wen CM et al, 1990). A seguito di questi risultati la sericina è stata rimossa dai fili di sutura a base di seta presenti in commercio ed è stata sostituita con una copertura in cera o

silicone, evitando in questo modo reazioni di ipersensibilità mediata dalle cellule T (Altman GH et al, 2003). Scaffold di fibroina privata della sericina e impiantati nel sottocute di topi provocarono la sola induzione di una debole risposta anticorpale senza nessun principio di fibrosi (Vepari C et al, 2007).

La biocompatibilità della fibroina viene pertanto considerata a pari livello con quella di polimeri sintetici e naturali quali acido poliglicolico, acido polilattico, polistirene, poli-2-idrossimetilacrilato e collagene (Meinel L et al, 2005 (a); Aramwit P et al, 2009).

### 3.2 *La biodegradabilità della fibroina*

La biodegradabilità di un biomateriale polimerico, che consiste nella sua demolizione in composti a minor peso molecolare, gioca un ruolo importantissimo nell'ambito della sua applicazione *in vivo*: in particolar modo deve essere attentamente calibrato il controllo sulla velocità di degradazione, così che permanga nell'organismo solo il tempo necessario a svolgere la sua funzione (Cao Y et al, 2009).

La fibroina, biomateriale approvato dalla *Food and Drug Administration* (FDA), è classificata come non degradabile poiché conserva più del 50% della sua resistenza alla trazione sessanta giorni dopo l'impianto *in vivo*; tuttavia tutti gli studi finora effettuati dimostrano che la biodegradazione della fibroina ed il suo riassorbimento avvengono *in vivo* in periodi di tempo maggiori, tipicamente entro un anno (Horan RL et al, 2005). Già dopo cinque mesi è possibile dimostrare la totale perdita di resistenza alla trazione di un filo di seta (Gellynck K, 2006).

A differenza di quanto accade con materiali sintetici quali l'acido polilattico (PLA), i cui prodotti di degradazione abbassano il pH fisiologico scatenando l'infiammazione, la fibroina biodegradandosi non causa una risposta infiammatoria (Vepari C et al, 2007) poiché i suoi prodotti di degradazione finali sono gli amminoacidi costituenti la proteina, i quali vengono facilmente riassorbiti *in vivo* (Cao Y et al, 2009).

La fibroina viene classificata come un polimero soggetto a degradazione enzimatica, in particolare da parte di enzimi proteolitici quali chimotripsina, carbossilasi e actinasi responsabili dell'idrolisi del legame ammidico. La velocità ed il grado di degradazione possono essere molto variabili e sono determinati essenzialmente dalla morfologia del

substrato, dal tipo di enzimi presenti, dall'ambiente biologico nel sito di impianto e da eventuali stress fisici o meccanici (Arai T et al, 2004; Cao Y et al, 2009).

È da tenere in considerazione inoltre che il *Bombyx mori* produce nelle ghiandole serigene un inibitore delle proteasi, la cui funzione è proteggere la seta da una prematura degradazione proteolitica (Kurioka A et al, 1999).

La biodegradazione della fibroina è differente a seconda dell'enzima in causa: in particolare Horan et al. investigarono l'azione di differenti enzimi proteolitici e a diversi tempi di esposizione; comparando la proteasi XIV con l' $\alpha$ -chimotripsina osservarono che con il primo enzima il peso molecolare ed il modulo elastico della fibroina diminuivano significativamente dopo una settimana, mentre con l' $\alpha$ -chimotripsina rimanevano sostanzialmente invariati (Horan RL et al, 2005). Queste differenze sono spiegate da diversi meccanismi d'azione: la chimotripsina mostra, infatti, maggior propensione ad attaccare le regioni amorfe della fibroina, degradando selettivamente la fibroina in conformazione *silk I*, ma non quella in conformazione  $\beta$ -sheet, viceversa l'azione di altre proteasi, come la proteasi XIV, è rivolta maggiormente verso le regioni cristalline. L'azione dell' $\alpha$ -chimotripsina su membrane di fibroina produce, infatti, un incremento dell'indice di cristallinità dei residui insolubili recuperati dopo la proteolisi, poiché tale enzima idrolizza preferenzialmente i legami peptidici presenti nelle regioni amorfe, più accessibili a molecole relativamente ingombranti, lasciando praticamente inalterate le regioni cristalline (Li M et al, 2003; Arai T et al, 2004).

La degradazione di scaffold di fibroina è molto influenzata dalle modalità con cui gli scaffold vengono ottenuti; in generale il grado di cristallinità e di porosità e le dimensioni dei pori giocano un ruolo fondamentale (Vepari C et al, 2007).

### 3.3 La sterilizzazione della fibroina

La fibroina come biomateriale possiede l'importante caratteristica, rispetto ad altre proteine fibrose, come ad esempio il collagene, di poter essere sterilizzata senza subire degradazione. Tale caratteristica risulta particolarmente importante poiché ciascun tipo

di materiale destinato all'impianto deve essere obbligatoriamente sterile (Vepari C et al, 2007).

Diversi studi hanno dimostrato che la sterilizzazione per mezzo di vapore saturo sotto pressione rappresenta il metodo di elezione per la sterilizzazione della fibroina.

La sterilizzazione mediante vapore saturo sotto pressione è stata applicata da vari autori seguendo i parametri dettati dalla Farmacopea Europea: 121°C per 15 minuti ad una pressione di 2 atmosfere (Meinel L et al, 2004; Gellynck K, 2006; Wang et al, 2006 (a); Hofmann S et al, 2007; Von Rechenberg B et al, 2007; MacIntosh AC et al, 2008; Lawrence BD et al, 2008). Le proprietà della fibroina non sono risultate variate in nessun caso, al contrario Lawrence et al. verificarono tramite analisi FT-IR che la sterilizzazione in autoclave forniva, piuttosto, un vantaggio poiché aumentava il contenuto di strutture  $\beta$ -sheet e riduceva le regioni in conformazione *silk I*, mantenendo, al tempo stesso, l'integrità e le proprietà meccaniche del materiale (Lawrence BD et al, 2008).

Dopo sterilizzazione in autoclave, il contenuto in  $\beta$ -sheet della fibroina risulta maggiore del 50%. Tale fenomeno trova spiegazione nelle seguenti ragioni: l'elevata pressione applicata aumenta il modulo elastico dei polimeri incrementando contemporaneamente l'indice di cristallinità; il vapore saturo, invece, diminuisce la temperatura di transizione vetrosa ( $T_g$ ) della fibroina, condizione che, combinata con l'aumento di temperatura, favorisce il movimento ed il riarrangiamento delle catene, nella conformazione *silk II*, termodinamicamente favorita (Lawrence BD et al, 2008).

### 3.4 *La fibroina della seta rigenerata*

La fibroina della seta allo stato nativo presenta una struttura macromolecolare ordinata e cristallina con elevato livello di impaccamento delle singole catene polipeptidiche.

Al fine di ottenere scaffold con morfologie diverse da quella assunta dalla proteina allo stato nativo, è necessaria la disgregazione di questa struttura altamente ordinata e compatta attraverso l'uso di un solvente in grado di rigonfiare le fibre, diffondere al loro interno e rompere i ponti idrogeno senza incorrere nella degradazione delle molecole di fibroina. Solitamente ciò si ottiene ponendo le fibre in soluzioni saline concentrate a 65°C e la soluzione ottenuta viene successivamente dializzata con

membrane fino a completa eliminazione dei sali. La fibroina risultante si trova nella conformazione *silk I*, instabile e solubile. La conformazione *silk II* deve essere poi ricostituita durante la fase di rigenerazione per rendere il materiale insolubile nel medium fisiologico e perciò adatto all'impiego nel settore biomedico (Mathur AB et al, 1997; Rice WL et al, 2008; Garcia-Fuentes M et al, 2008). I metodi di rigenerazione sono diversi a seconda che si vogliano ottenere film, idrogeli, reti o scaffold 3D della proteina.

La fibroina della seta rigenerata è stata utilizzata come materiale di rivestimento per vari tipi di scaffold polimerici.

Cai et al. riferirono che il rivestimento di film di acido poli(D, L-lattico) con fibroina della seta rigenerata migliorava l'interazione tra osteoblasti e il film polimerico (Cai K et al, 2002). Petrini et al. ricoprirono la superficie di scaffold 2D e 3D in poliuretano immergendo gli stessi in una soluzione 3-4% p/p di fibroina della seta ottenuta da *B. mori*, con formazione di rivestimenti stabili di fibroina con uno spessore di 200-600 nm. Il trattamento con metanolo ulteriormente stabilizzava i rivestimenti inducendo una transizione verso la struttura  *$\beta$ -sheet* della fibroina (Petrini P et al, 2001).

Chiarini et al. esaminarono l'effetto di rivestimenti di fibroina della seta su substrati 2D di poli(carbonato)-uretano nei confronti di proliferazione, metabolismo e sintesi di ECM per quattro ceppi di fibroblasti umani. Il rivestimento di fibroina migliorava l'adesione cellulare di 2,2 volte, il che determinò un aumento di 2,5 volte del numero di cellule totale al trentesimo giorno di coltura. Allo stesso tempo, il rivestimento di fibroina della seta influenzava il metabolismo dei fibroblasti, inducendo un massiccio assorbimento di glucosio ed un minor consumo di glutamina per cellula nelle prime fasi della coltura. Il rivestimento, inoltre, migliorava l'assemblaggio extracellulare del collagene di tipo I (Col-I), il maggior contributo dei fibroblasti nella formazione dell'ECM. I fibroblasti seminati su substrati rivestiti di fibroina della seta non secernevano apprezzabili livelli di citochine come IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , o TGF- $\beta$ 1, tutte implicate nelle reazioni di infiammazione e nella riparazione dei tessuti durante la guarigione delle ferite, ma la secrezione di IL-6, un'altra importante citochina coinvolta nelle reazioni di infiammazione e cicatrizzazione delle ferite, aumentava dopo due settimane di coltura (Chiarini et al, 2003).

Utilizzando una metodologia simile, Dal Pra et al. studiarono la risposta cellulare di fibroblasti umani seminati su scaffold 3D in poliuretano rivestiti con fibroina della seta. Il rivestimento influiva sull'adesione, la proliferazione e il metabolismo cellulare in modo simile a quanto si era verificato sui substrati 2D studiati da Chiarini et al. Anche in questo sistema non erano identificate citochine come IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ 1 e, contrariamente a quanto si verificava con i supporti 2D, la fibroina della seta che ricopriva gli scaffold 3D non influenzava l'espressione di IL-6 o la secrezione extracellulare di Col-I (Dal Pra I et al, 2003).

Queste differenze indicano la complessità del trasferimento di informazioni ottenute in sistemi 2D a strutture 3D di biomateriale. Indipendentemente da ciò, questi studi hanno fornito una base sperimentale per il potenziale utilizzo della fibroina della seta rigenerata come materiale di rivestimento per scaffold di differenti materiali nell'ingegneria dei tessuti.

Wang et al. utilizzarono una tecnica di deposizione acquosa graduale (*layer-by-layer*) per la produzione di substrati ricoperti con sottili nano-film di fibroina della seta e valutarono la risposta delle cellule staminali mesenchimali (MSCs) umane derivate dal midollo osseo ai diversi rivestimenti. Meccanicisticamente, interazioni idrofobiche e parziali interazioni elettrostatiche erano le forze trainanti per la deposizione e la stabilizzazione della fibroina della seta sulle superfici di substrato solido; pertanto, sia materiali idrofobi che idrofili potevano essere ricoperti. Lo spessore dei rivestimenti multistrato era correlata linearmente con il numero di strati, ognuno dei quali aveva uno spessore controllato di poche decine di nanometri a seconda della concentrazione di fibroina e del sale nella soluzione usata nel processo. I film di fibroina della seta erano stabili e permettevano l'adesione, la proliferazione e la differenziazione delle cellule staminali mesenchimali di midollo osseo umane (Wang X et al, 2005).

La tecnica di Wang et al., semplice e versatile, possiede le potenzialità per essere utilizzata nella produzione di film di fibroina della seta con caratteristiche morfologiche e strutturali controllate per applicazioni cliniche quali la somministrazione di farmaci e l'ingegneria tissutale.

Sofia et al. osservarono un'adesione cellulare maggiore nei film di fibroina ricavata dal bozzolo di *Antheraea pernyi*, la specie selvatica del baco da seta, rispetto a quella riscontrata nella fibroina di *Bombyx mori*. La differenza venne attribuita alla presenza,

nella sequenza della proteina proveniente dall'*A. pernyi*, del tripeptide Arg(R)-Gly(G)-Asp(D) o RGD il quale agisce da sito di riconoscimento per l'adesione cellulare mediata da integrine portando ad un'interazione più specifica tra cellule e fibroina e ad un incremento nell'idrofilia della proteina stessa. Per tale ragione la fibroina di *Bombyx mori*, la quale si presta facilmente ad essere trasformata chimicamente tramite modificazione delle catene laterali degli amminoacidi, venne funzionalizzata con successo mediante l'attacco covalente della sequenza RGD e di altri fattori di crescita e riconoscimento cellulare. L'accoppiamento di RGD ai film di fibroina della seta portava beneficio all'adesione, alla diffusione, alla proliferazione e alla differenziazione di osteoblasti umani Saos-2, fibroblasti e cellule stromali del midollo osseo (Sofia S et al, 2001).

Allo stesso modo, Kardestuncer et al. dimostrarono che la modifica della fibroina con RGD rafforzava l'adesione e la proliferazione di tenociti umani e supportava la loro differenziazione, come evidenziato dagli elevati livelli di trascrizione di decorina e Col-I (Kardestuncer T et al, 2006).

L'aumentata differenziazione delle cellule su matrici di seta accoppiate ad RGD è probabilmente dovuta ad una maggiore densità cellulare, che migliora le interazioni cellula-cellula (Chen J et al, 2003).

Sofia et al. dimostrarono, inoltre, che la modificazione della superficie con ormone paratiroideo (PTH), che incide sulla differenziazione degli osteoblasti *in vitro* (Ishizuya T et al, 1997) e *in vivo* (Uzawa T et al, 1995) se utilizzato in forma solubile, poteva migliorare l'adesione cellulare, ma non la differenziazione degli osteoblasti umani Saos-2 su film di fibroina della seta (Sofia S et al, 2001).

Più di recente, Karageorgiou et al. dimostrarono che i film di fibroina della seta uniti alla proteina morfogenetica dell'osso-2 (BMP-2) tramite accoppiamento covalente aumentavano la differenziazione osteogenica delle cellule stromali umane derivate dal midollo osseo. Rispetto alla BMP-2 adsorbita, quella accoppiata con legame covalente veniva mantenuta in superficie a livelli significativamente più elevati e per un periodo più lungo nel terreno di coltura. In una settimana, il 70% della BMP-2 adsorbita veniva rilasciato dalla superficie del film. Entro la fine della quarta settimana solo il 10% della BMP-2 adsorbita era rimasto nel film, mentre il 50% della BMP-2 accoppiata covalentemente era ancora presente. Nonostante ciò, sia la BMP-2

accoppiata in modo covalente, sia quella adsorbita in superficie rimanevano attive e potenziavano la differenziazione osteogenica delle cellule stromali del midollo osseo; l'immobilizzazione covalente della BMP-2 risultava, però, più efficace probabilmente a causa di una degradazione più lenta della stessa e della sua maggior concentrazione nel microambiente locale (Karageorgiou V et al, 2004).

Nel complesso, questi studi hanno dimostrato che la diversità delle catene laterali dei residui aminoacidici contenuti nella fibroina della seta fornisce utili e accessibili opportunità per la modificazione della superficie con leganti di adesione e specifici fattori di crescita/morfogeni. Nella maggior parte dei casi, l'attività biologica è stata mantenuta e in alcuni casi migliorata. Queste strategie aprono la strada ad ulteriori possibilità di miglioramento chimico selettivo della fibroina della seta al fine di orientare la risposta di cellule e tessuti nel contesto dell'ingegneria tissutale.

La struttura e le proprietà dei film di fibroina rigenerata possono essere ulteriormente modificate mediante la miscelazione con altri polimeri naturali e sintetici, come la cellulosa (Freddi G et al, 1995; Yang G et al, 2000), il chitosano (Chen X et al, 1997 (a,b)), l'ossido di polietilene (Jin HJ et al, 2004 (a)), la poliacrilamide (Freddi G et al, 1999), il glicole polietilenico (Kweon HY et al, 2001), l'alcol polivinilico (Tsukada M et al, 1994), il poli( $\epsilon$ -caprolattone-*co*-D, L-lattide) (Kesenci K et al, 2001), il collagene (Hu K et al, 2006), la poliallilamide (Arai T et al, 2002), la S-carbossimetil cheratina (Lee KY et al, 1998; Lee KY et al, 1999), e altri. Sebbene la maggior parte di questi materiali non siano stati completamente testati *in vivo* per la loro biocompatibilità e degradabilità, alcuni studi hanno dimostrato che film di fibroina della seta e alcuni suoi compositi promuovono la guarigione *in vivo* se usati come medicazione (Sugihara A et al, 2000; Yeo JH et al, 2000).

Oltre ai film, anche idrogeli possono essere formati da una soluzione di fibroina della seta rigenerata attraverso una transizione sol-gel in presenza di acido, ioni, o modificando fattori come la temperatura, la concentrazione di fibroina e il pH (Chen X et al, 1997 (b); Kim UJ et al, 2004; Motta A et al, 2004). In generale, il tempo di gelificazione diminuisce con l'aumento della concentrazione di fibroina, della temperatura, della concentrazione di additivi come  $\text{Ca}^{2+}$ , glicerolo e ossido di polietilene, o con la diminuzione del pH (Kim UJ et al, 2004). Idrogeli di fibroina della seta sono stati studiati per il rilascio controllato di agenti bioattivi quali DNA

plasmidico, virus, e fattori di crescita (Megeed Z et al, 2002; Haider M et al, 2004); solo recentemente sono stati studiati per il loro potenziale utilizzo nella riparazione guidata dei tessuti.

Fini et al. riferirono l'utilizzo di idrogeli di fibroina della seta rigenerata nella riparazione di difetti ossei nel coniglio. Gli idrogeli furono preparati con l'aggiunta di acido citrico 1 M ad una soluzione acquosa al 2% p/v di fibroina fino al superamento del punto isoelettrico (3,8), seguita da un trattamento a 50°C durante la notte. Poiché l'acidità degli idrogeli di fibroina risultanti (pH=3,3) non era adatta per colture cellulari, gli idrogeli furono immersi in una soluzione allo 0.9% di NaCl a 37°C per tre giorni. Gli idrogeli estratti alla fine del terzo giorno (pH=5,8) furono valutati per la loro citotossicità e citocompatibilità *in vitro* utilizzando una linea cellulare di osteosarcoma umano (MG63). Gli idrogeli di fibroina della seta mostravano citocompatibilità paragonabile a quella dell'acido poli(lattico-co-glicolico) (PLGA), utilizzato come controllo, sulla base di risposte come proliferazione cellulare, differenziazione e rilascio della citochina IL-6 correlata all'infiammazione. Nonostante l'apparente basso pH, gli idrogeli di fibroina della seta sostenevano la guarigione di difetti critici dell'osso *in vivo* in dodici settimane senza evidenti reazioni infiammatorie (Fini M et al, 2005).

Attraverso la liofilizzazione, spugne microporose di fibroina della seta possono essere formate a partire da idrogeli.

Morita et al. ed Aoki et al. combinarono spugne microporose di fibroina della seta con condrociti di coniglio appena isolati per l'ingegneria del tessuto cartilagineo. Durante la coltura, i condrociti nella spugna di fibroina proliferavano e mantenevano il fenotipo differenziato meglio che nel gel di collagene usato come controllo. Le proprietà meccaniche del tessuto cartilagineo rigenerato risultavano diverse in funzione della deposizione temporale e spaziale della matrice extracellulare (Aoki H et al, 2003; Morita Y et al, 2006).

Questi risultati suggeriscono il potenziale utilizzo delle spugne di fibroina della seta derivate dagli idrogeli come scaffold porosi tridimensionali per la rigenerazione della cartilagine attraverso i condrociti.

Attraverso il processo di elettrofilatura (*electrospinning*) possono essere preparate reti nano-fibrose non tessute a partire da soluzioni di fibroina.

Jin et al. e Min et al. riferirono che reti nano-fibrose non tessute di fibroina della seta sostenevano l'adesione, la diffusione e la proliferazione di cellule stromali umane derivate dal midollo osseo, di cheratinociti e fibroblasti *in vitro* (Min BM et al, 2004; Jin HJ et al, 2004 (b)).

Kim et al. esaminarono la biocompatibilità *in vivo* di reti nano-fibrose non tessute di fibroina della seta e il loro effetto sulla riparazione guidata di difetti ossei critici nel coniglio. Le reti erano formate tramite elettrofilatura di una soluzione di fibroina della seta in acido formico al 98%, successivamente trattate con metanolo al 50% per 60 minuti a temperatura ambiente ed infine asciugate per ventiquattro ore sotto vuoto. Le reti nano-fibrose non tessute risultanti contenevano fibre depositate in modo casuale con diametri da 150 a 300 nm. Le membrane sostenevano l'adesione *in vitro*, la diffusione, la proliferazione e la differenziazione delle cellule della linea osteoblastica MC3T3-E1. Quando studiate *in vivo*, in un modello osseo di coniglio, le reti nano-fibrose non tessute di fibroina della seta mostravano una buona biocompatibilità e stabilità strutturale ed erano in grado di aumentare la formazione ossea nell'arco di dodici settimane senza evidenze di reazioni infiammatorie. I risultati di questo studio suggeriscono il potenziale delle reti nano-fibrose non tessute di fibroina della seta nella rigenerazione guidata dell'osso (Kim KH et al, 2005).

Scaffold 3D porosi possono essere ottenuti da una soluzione di fibroina della seta rigenerata derivata da *B. mori* attraverso un processo acquoso, oppure attraverso un processo che impiega il solvente organico esafluoroisopropanolo (HFIP), insieme a dissoluzione di sale (*salt leaching*), schiumatura con gas (*gas foaming*) o liofilizzazione per generare pori interconnessi.

Scaffold 3D altamente porosi sono preparati con dissoluzione di sale per ottenere un'utile combinazione di elevata resistenza alla compressione e pori interconnessi uniformi. Le caratteristiche morfologiche e strutturali degli scaffold prodotti tramite dissoluzione di sale dipendono da una serie di variabili tra cui concentrazione di fibroina, caricamento di particelle solide di sale, dimensione delle particelle e uso del processo acquoso o HFIP-derivato. Indipendentemente dal processo utilizzato, durante la formazione di questi scaffold la fibroina della seta subisce una transizione strutturale da insieme di avvolgimenti casuali a strutture  *$\beta$ -sheet*; gli scaffold derivati dal processo acquoso possiedono, però, una migliore interconnettività dei pori,

superfici più ruvide e più idrofile e più alta resistenza meccanica rispetto agli scaffold HFIP-derivati (Nazarov R et al, 2004; Kim UJ et al, 2005).

Meinel et al. e Kim et al. studiarono scaffold 3D porosi di fibroina della seta HFIP-derivati e derivati dal processo acquoso nell'ingegneria del tessuto osseo *in vitro* e *in vivo* utilizzando cellule staminali mesenchimali. Prima della semina le MSCs furono caratterizzate per l'espressione di marcatori di superficie e la capacità di differenziare in cellule di più linee: le MSCs risultarono positive per CD105, CD44 e CD71, negative per CD34 e CD31, e dimostrarono la capacità di differenziare nelle linee condrogenica e osteogenica. Quando coltivate in condizioni statiche, per quattro settimane, in mezzo di coltura contenente BMP-2, le MSCs seminate su scaffold HFIP-derivati (dimensione dei pori ~200  $\mu\text{m}$ ) mostravano una maggiore differenziazione osteogenica rispetto al controllo (scaffold di collagene), come valutato da *real time* RT-PCR per i marcatori genici correlati all'osso, da analisi immunostochimiche e da tomografia micro-computerizzata per la deposizione del calcio. La modifica degli scaffold con RGD rafforzava ulteriormente la differenziazione delle cellule staminali mesenchimali e permetteva la formazione di strutture della matrice extracellulare più organizzate, nelle stesse condizioni di coltura. Quando coltivate in condizioni dinamiche, la stabilità degli scaffold HFIP-derivati portava benefici in termini di mantenimento delle cellule ad una elevata densità e di promozione della differenziazione delle MSCs. Dopo cinque settimane di coltura in agitazione a 60 rpm, le MSCs generavano con successo reti di osso simil-trabecolare con una matrice extracellulare simile a quella dell'osso fisiologico. Successivamente, il tessuto osseo ingegnerizzato fu impiantato in topi nudi per la riparazione di difetti ossei craniali di dimensioni critiche e confrontato con l'impianto di scaffold appena seminati, di scaffold privi di cellule e con i difetti non riparati. Cinque settimane dopo l'impianto, gli impianti di tessuto osseo ingegnerizzato e di scaffold appena seminati ben si integravano con il tessuto circostante e risultavano positivi, dopo colorazione, per la sialoproteina, l'osteopontina e l'osteocalcina, che non venivano osservate nei controlli (scaffold non seminati e difetti non riparati). Rispetto agli impianti con MSCs appena seminate, gli impianti di osso ingegnerizzato mostravano la formazione ossea più consistente. Entro cinque settimane, questi impianti di tessuto ingegnerizzato

iniziavano a trasformarsi da reti di osso simil-trabecolare a strutture coalescenti, simili a quelle presenti nel processo di guarigione fisiologico dell'osso.

Nell'insieme, queste osservazioni suggeriscono che un approccio di ingegneria dei tessuti che combina scaffold 3D porosi di fibroina della seta rigenerata e MSCs è promettente per la riparazione di difetti ossei di dimensioni critiche (Meinel L et al, 2005 (b); Kim HJ et al, 2005).

La combinazione di elevata resistenza, porosità, lavorabilità, buona biocompatibilità, capacità di supportare l'adesione, la proliferazione e la differenziazione cellulare identifica gli scaffold 3D porosi di fibroina della seta come candidati per l'utilizzo nell'ingegneria del tessuto cartilagineo con cellule staminali e condrociti.

Meinel et al. per primi combinarono scaffold porosi 3D di fibroina della seta HFIP-derivati (dimensione dei pori ~200 µm) e MSCs per l'ingegneria del tessuto cartilagineo *in vitro* e confrontarono i risultati rispetto a quelli ottenuti con scaffold di collagene non modificato e collagene reticolato. In similitudine con le osservazioni prodotte dagli studi di ingegneria del tessuto osseo, gli scaffold strutturalmente stabili e con lenta degradazione (scaffold di collagene reticolato e di fibroina) erano essenziali per mantenere una sufficiente densità cellulare e per promuovere la formazione di una matrice extracellulare simil-cartilaginea, come valutato dal contenuto di DNA totale e dalla deposizione di glicosaminoglicani (GAG). Dopo quattro settimane, le MSCs negli scaffold porosi di fibroina della seta avevano depositato una maggiore quantità di proteine extracellulari cartilagine-specifiche (GAG e collagene II (Col-II)) ed esprimevano livelli più elevati di mRNA di Col-II rispetto alle MSCs coltivate negli scaffold a base di collagene (Meinel L et al, 2004).

Wang et al. utilizzarono scaffold 3D porosi di fibroina della seta derivati dal processo di produzione acquoso (dimensione dei pori ~550 µm) per l'ingegneria della cartilagine *in vitro* coltivando MSCs e condrociti. Le MSCs negli scaffold di fibroina derivati dal processo acquoso aderivano con successo, proliferavano e differenziavano nella linea condrogenica sulla base di valutazioni istologiche, immunostochimiche e analisi mediante microscopia confocale e *real time* RT-PCR. Nell'ambiente di coltivazione 3D, creato dagli scaffold altamente porosi di fibroina della seta, entro tre settimane, la maggior parte delle MSCs erano incorporate in spazi simili a lacune e avevano acquisito una morfologia sferica, rivelatasi essenziale per la sintesi di

componenti dell'ECM collegati al tessuto cartilagineo. In presenza di induttori come desametasone e TGF- $\beta$ 3, la proliferazione delle MSCs raggiungeva il picco a 7-9 giorni causando anche il passaggio ad una fase più attiva di differenziazione. Entro tre settimane, le MSCs esprimevano alti livelli di trascritti dell'ECM cartilagine-correlati (Col-II, aggrecano (AGC), collagene X (Col-X) e collagene I (Col-I)) e depositavano una ECM ricca in Col-II e proteoglicani solfati come valutato dall'istologia e dall'immunoistochimica. Sebbene l'espressione di mRNA di Col-I fosse apprezzabile, Col-I non era più individuabile nello scaffold di fibroina alla fine della terza settimana di coltura. Depositi di calcio non si verificavano in nessuna delle colture 3D come valutato dalla colorazione di von Kossa che confermava l'assenza di osteogenesi. Una distribuzione piuttosto omogenea di cellule ed ECM veniva ottenuta grazie alle caratteristiche uniche di questi scaffold derivati dal processo di fabbricazione acquoso, comprese la superficie ruvida e idrofila e l'ottima inter-connettività dei pori. Entro la terza settimana, i costrutti di fibroina della seta ed MSCs acquisivano una struttura zonale unica con un sottile e denso strato esterno, contenente cellule con morfologia fibroblastica, che racchiudeva una zona intermedia e una zona più interna composte da cellule più piccole con una morfologia più sferica, incorporate in uno spazio simile ad una lacuna nell'abbondante ECM cartilaginea. Anche la distribuzione di Col-II nel costrutto 3D mostrava un andamento zonale con una maggior quantità di proteina depositata nelle regioni esterne, un'architettura simile al tessuto cartilagineo articolare nativo (Wang Y et al, 2005).

Wang et al. combinarono, inoltre, condrociti umani adulti (hCHs) con scaffold porosi di fibroina della seta derivati dal processo acquoso (dimensione dei pori  $\sim$ 550  $\mu$ m) per l'ingegneria del tessuto cartilagineo *in vitro* e confrontarono i risultati con lo studio precedente che usava gli stessi scaffold associati a MSCs. Gli hCHs furono isolati da tessuti articolari adulti normali ed espansi in colture monostrato in presenza di 1ng/mL di TGF- $\beta$ 1, 10ng/mL di fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF) e di 5 ng/mL di fattore di crescita dei fibroblasti (FGF). Dopo la semina, gli hCHs aderivano allo scaffold, proliferavano e ridifferenziavano sulla base della morfologia cellulare, dell'espressione di trascritti genici cartilagine-correlati e della presenza di una matrice extracellulare simil-cartilaginea ricca di GAG e Col-II. Rispetto alle MSCs, gli hCHs

attaccavano più lentamente sugli scaffold 3D di fibroina della seta. La densità cellulare risultava critica per la differenziazione degli hCHs espansi in coltura negli scaffold 3D di fibroina derivati dal processo acquoso. I trascritti cartilagine-correlati (AGC, Col-I, Col-II) erano sovra-regolati in modo significativo ed era osservata una deposizione uniforme di componenti extracellulari specifici della matrice cartilaginea (Col-II e GAG). I costrutti di fibroina della seta e hCHs erano significativamente diversi rispetto a quelli con MSCs nei confronti della morfologia delle cellule e della struttura zonale. Quasi tutti gli hCHs coltivati negli scaffold porosi di fibroina della seta acquisivano una morfologia sferica dopo tre settimane di coltivazione (Wang Y et al, 2006 (b)). I risultati di questi due studi di Wang et al. suggeriscono differenze fondamentali tra l'ingegneria tissutale che utilizza cellule staminali (MSCs) e l'ingegneria tissutale che impiega cellule differenziate (hCHs); nell'insieme, però, dimostrano il potenziale degli scaffold 3D porosi di fibroina della seta nell'ingegneria del tessuto cartilagineo.

### *3.5 La fibroina della seta nativa*

Se gli esempi di applicazione di scaffold in fibroina rigenerata nell'ingegneria dei tessuti sono molteplici, al contrario, le applicazioni della fibroina nativa risultano meno numerose.

La fibroina nativa, processata con le tecniche di tessitura tradizionali, trova uno dei suoi maggiori impieghi nel campo biomedicale come filo di sutura; recentemente la fibroina nativa filata è stata studiata nell'ingegneria del legamento crociato.

Altman et al. per primi esplorarono le potenzialità delle fibre di fibroina nativa filate come scaffold 3D per l'ingegneria tissutale del legamento crociato anteriore (LCA) in colture con caricamento meccanico dinamico. Dopo l'estrazione della sericina, fibre di fibroina filate furono cablate in matrici a fune in modo da conferire alle stesse miglior elasticità e resistenza alla trazione quando confrontate con equivalenti matrici formate da fibre parallele. Questo tipo di matrice possedeva una struttura gerarchica simile a quella delle fibre di collagene presenti nel legamento crociato anteriore e le sue proprietà meccaniche erano paragonabili a quelle del legamento umano nativo nei confronti di resistenza, rigidità, punto di snervamento e allungamento percentuale a rottura. Inoltre, la geometria a fune aumentava l'area della superficie per l'adesione

delle cellule e la deposizione di ECM e minimizzava le limitazioni al trasferimento di massa, tutti elementi che contribuivano ad una maggiore formazione di nuovo tessuto. Tali scaffold sostenevano l'adesione, la diffusione, la proliferazione e la differenziazione di cellule staminali mesenchimali umane. Dopo tre settimane di coltura statica, gli scaffold mantenevano la resistenza meccanica. Alla seconda settimana i livelli di espressione dei trascritti correlati al legamento (tenascina-C, collagene III (Col-III) e Col-I) risultavano elevati. In confronto, l'espressione di geni correlati all'osso o alla cartilagine non era significativamente influenzata, suggerendo che tali scaffold inducessero la differenziazione legamento-specifica delle MSCs umane (Altman GH et al, 2002 (a,b)). La differenziazione legamento-specifica veniva ulteriormente rafforzata in un bioreattore controllato da computer che impartiva forze meccaniche complesse alle matrici di fibroina (Altman GH et al, 2002 (c)).

Horan et al. studiarono le proprietà meccaniche di filati di fibroina nativa fabbricati utilizzando quattro differenti metodi tessili (ritorto, cablato, intrecciato e testurizzato) per formare geometrie diverse; le proprietà meccaniche dei filati risultarono influenzate significativamente dai metodi di fabbricazione, soprattutto se testate in condizioni di idratazione per simulare l'ambiente fisiologico. Sulla base delle caratteristiche meccaniche, i filati intrecciati e testurizzati si dimostrarono inadatti per applicazioni in ingegneria dei tessuti dove erano necessari carico regolare/non-carico e crescita dei tessuti. Tra i quattro metodi tessili, i filati cablati possedevano una struttura gerarchica altamente organizzata che consentiva la massima flessibilità meccanica. Modificazioni superficiali, come accoppiamento ad RGD e trattamento al plasma avevano un'influenza significativa sulla resistenza meccanica dei filati. Il trattamento al plasma con  $\text{NH}_3$  e  $\text{N}_2$  diminuiva la resistenza del filato del 7,2% e 3,5%, rispettivamente, ma non ne influenzava la rigidità. La modifica della superficie con RGD determinava un aumento del 13,1% in resistenza meccanica ed una diminuzione dell'11,4% della rigidità dei filati, oltre all'effetto positivo di questo trattamento sull'adesione cellulare, la proliferazione e la differenziazione. In sintesi, se destinati ad applicazioni in ingegneria dei tessuti, il disegno dei filati dovrebbe prendere in considerazione le seguenti caratteristiche: (a) dimensioni e ambiente fisiologico degli impianti; (b) proprietà meccaniche (resistenza, rigidità, resa e fatica) in condizioni di carico regolare/non-carico; (c) proprietà di superficie (area superficiale e modifiche

della superficie con leganti funzionali come RGD); (d) *void volume*/lunghezza se è prevista la crescita del tessuto; (e) biocompatibilità e velocità di degradazione in vivo (Horan RL et al, 2006).

La fibroina della seta nativa è stata inoltre studiata per applicazioni nell'ambito dell'ingegneria tissutale sotto forma di reti non tessute.

Unger et al. esaminarono reti non tessute di fibroina della seta nativa altamente purificata in sistemi di coltura *in vitro* per determinare se questo materiale sostenesse la crescita di cellule umane con origine tissutale differente. Queste reti erano composte da una maglia di fibre orientate in modo casuale con diametro variabile tra i 10 e 30  $\mu\text{m}$ . Spazi tridimensionali tra le fibre, con dimensioni fino a circa 300  $\mu\text{m}$ , erano distribuiti in tutta la struttura e le singole fibre in generale mostravano una superficie liscia (Fig. 3).

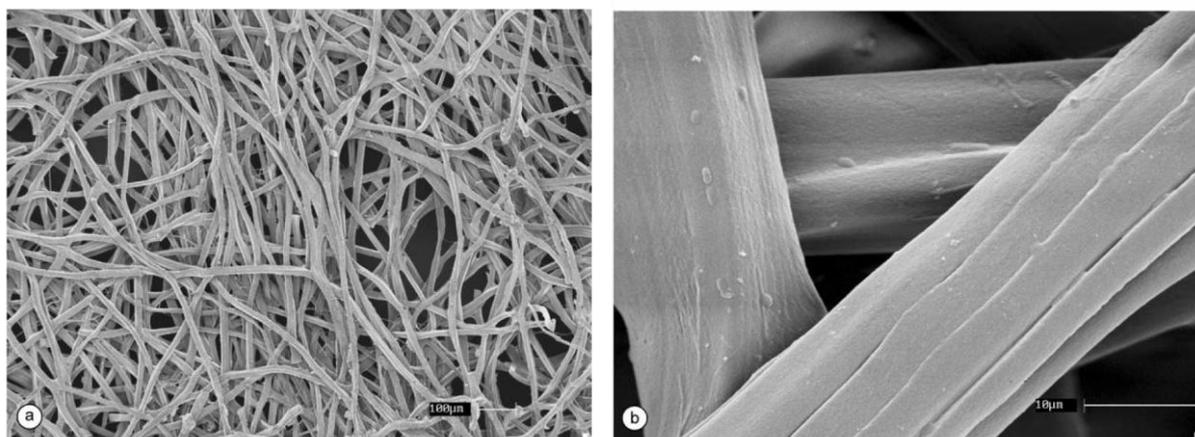


Fig. 3: Immagini al microscopio elettronico a scansione di una rete non tessuta di fibroina della seta: (a) immagine a basso ingrandimento che mostra fibre individuali; (b) immagine ad alto ingrandimento che mostra la superficie relativamente liscia e arrotondata delle fibre (da Unger RE et al, 2004, modificato).

Fibroblasti, cheratinociti, osteoblasti, cellule endoteliali, cellule epiteliali e cellule gliali furono applicate alle reti di fibroina della seta e coltivate per un massimo di sette settimane. In tutti i casi, le cellule aderivano e diffondevano nelle reti di fibroina. Fatta eccezione per le cellule endoteliali, dopo che le cellule avevano completamente ricoperto le superfici disponibili sulle singole fibre di fibroina, veniva osservata la loro diffusione negli spazi tra le fibre. A questo livello le singole cellule venivano a trovarsi in contatto diretto le une con le altre formando strutture di connessione simil-tissutali (Fig. 4).

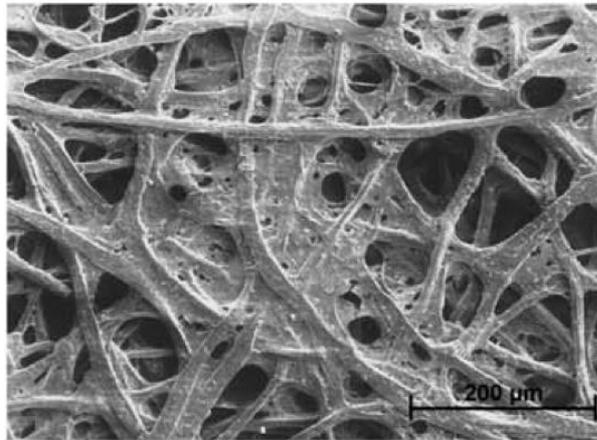


Fig. 4: Immagine al microscopio elettronico a scansione di cheratinociti HaCaT cresciuti per 5-7 settimane su rete non tessuta di fibroina nativa (da Unger RE et al, 2004, modificato).

Le cellule endoteliali differivano dalle altre linee cellulari. Queste cellule aderivano con difficoltà alle reti native, ma aderivano, al contrario, in modo significativo quando le reti venivano rivestite con fibronectina, gelatina o collagene. Questo fatto è simile a quanto si verifica nella coltura di cellule endoteliali su plastica; le cellule aderiscono e crescono meglio quando la plastica viene prima ricoperta da uno dei composti precedenti. Quando le reti erano rivestite, anche le cellule endoteliali aderivano alle singole fibre e, dopo replicazione e crescita, diffondevano lungo le singole fibre. Tuttavia, una volta che la superficie delle fibre di fibroina veniva ricoperta dalle cellule, queste smettevano di diffondere. Non veniva osservata nessuna crescita e diffusione delle cellule tra le fibre di fibroina, contrariamente a quanto veniva osservato con le altre linee cellulari. Per determinare se la crescita delle cellule producesse alcun effetto sulle reti, quale, per esempio, la loro degradazione, le reti di fibroina furono esaminate, dopo la crescita e la rimozione delle cellule, con microscopia elettronica a scansione. L'analisi SEM mostrava che la crescita cellulare sulle reti non esercitava alcun effetto sulla superficie delle fibre che apparivano del tutto simili a fibre non esposte a cellule (Fig. 5).

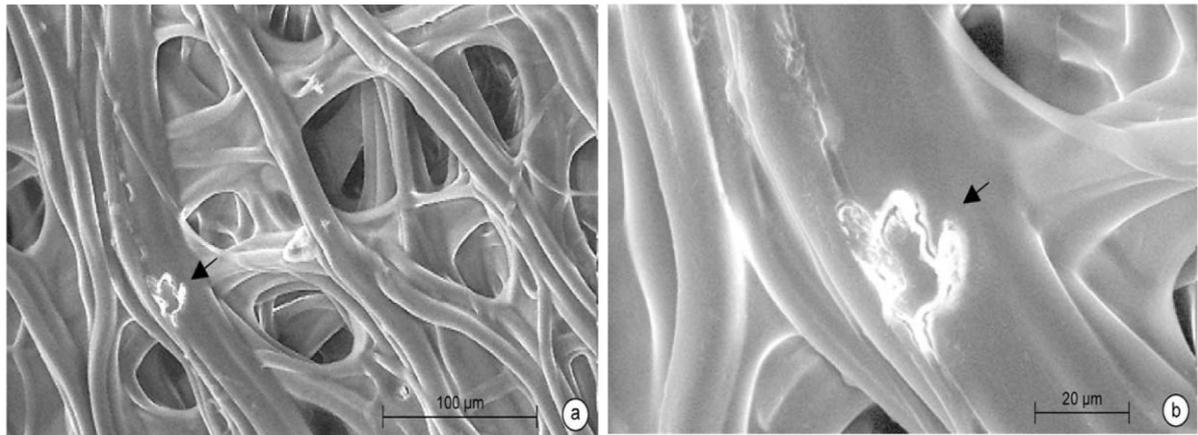


Fig. 5: Immagini al microscopio elettronico a scansione di rete non tessuta di fibroina della seta dalla quale sono state rimosse le cellule dopo 6 settimane di coltura. Le immagini, a basso (a) e ad alto (b) ingrandimento, si riferiscono alla rete utilizzata per la coltivazione delle cellule della linea osteoblastica MG63 (da Unger RE et al, 2004, modificato).

La crescita estensiva dei diversi tipi di cellule, nello specifico di osteoblasti e cheratinociti, rafforza la possibilità di un eventuale uso delle reti non tessute di fibroina della seta come biomateriale per la rigenerazione ossea e della cute (Unger RE et al, 2004).

I risultati di questo studio indicano che le reti non tessute di fibroina della seta nativa sostengono la crescita di una grande varietà di tipi cellulari umani senza alcun apparente effetto sulle reti stesse e potrebbero, quindi, rappresentare un utile biomateriale con numerose possibili applicazioni.

#### **4. Tessuto non tessuto di fibroina della seta nativa come scaffold per l'ingegneria tissutale**

Tessuto non tessuto (TNT) è il termine generico per indicare un prodotto simile a un tessuto, ma ottenuto con procedimenti diversi dalla tessitura, che incrocia i fili di trama e ordito tramite telaio, e dalla maglieria. L'unità di base per la produzione di un TNT sono le fibre, che possono essere naturali o sintetiche, e di conseguenza molte delle proprietà e della performance di un TNT sono dovute al tipo di fibra utilizzata.

Le fibre naturali comunemente utilizzate nella produzione di un TNT sono cotone, lana e fibre cellulosiche minori; quelle sintetiche sono viscosa, poliestere (PES), polipropilene (PP), poliammide (PA) e fibre di carbonio.

La produzione di un TNT si compone generalmente di tre fasi: formazione della rete; legame della rete; finissaggio.

Le fibre di partenza, solitamente costituite da materiale fibroso discontinuo compresso, sono ordinate in fogli o reti. Le metodiche di formazione della rete sono la *drylaid*, la *spunlaid* e la *wetlaid*.

La metodica *drylaid* può essere eseguita con il processo di cardatura, oppure con il processo *airlaid*. Il processo di cardatura consiste nella lavorazione delle fibre mediante un set di cilindri muniti di aghi i quali separano ed orientano le fibre trasformandole in un velo continuo. Tale processo permette l'orientamento delle fibre convertendole in una rete uniforme e fibrosa. Il processo *airlaid*, invece, inizia con un sistema di defibratura che apre le fibre le quali sono in seguito sospese in aria e depositate su un letto detto di formazione. Le fibre, spinte da un flusso d'aria, passano in una cinghia o in un tamburo perforato, in cui formano una rete con orientamento casuale. Rispetto alla rete cardata, queste reti hanno densità inferiore, migliore morbidezza e assenza della struttura laminare.

Nella metodica *spunlaid* la rete è ottenuta direttamente a partire dal polimero. Si parte dalla resina la quale viene fusa ed estrusa in filamenti che vengono raffreddati e depositati sopra ad un trasportatore per formare una rete uniforme.

La metodica *wetlaid* è simile al processo più tradizionale di produzione della carta. Si impiega come prodotto di partenza una sospensione acquosa (concentrazione 0.05%) di fibre corte e/o materiali grezzi a base di cellulosa, che viene deposta su di un piano metallico semovente e lasciata drenare per permettere la formazione della rete, che viene ulteriormente scolata, consolidata, attraverso pressatura tra dei rulli, ed essiccata in stufa. Con questa tecnica si possono utilizzare una vasta gamma di fibre naturali, minerali e sintetiche. L'utilizzo delle fibre sintetiche permette di aggiungere tenacità e flessibilità al prodotto.

Le reti formate hanno poca resistenza nella loro forma non-legata. La rete deve essere quindi consolidata. Questo è l'effetto del legame, un passaggio vitale nella produzione di un TNT. La scelta del metodo è importante per ultimare le proprietà funzionali.

Per molti anni quasi la totalità dei TNT richiedeva un legame chimico per poterne mantenere una buona integrità strutturale, negli ultimi anni però sono stati utilizzati come leganti differenti tipi di resine e colle naturali, inoltre sono stati sviluppati

leganti sintetici per andare incontro a specifiche richieste di tipo strutturale e di performance.

Esistono tre metodologie base per il legame: chimica; termica; meccanica.

Il legame chimico è un metodo di legame semplice ed è quello maggiormente utilizzato. Il legame chimico si riferisce principalmente all'applicazione su di una rete di un agente di legame liquido. Comunemente sono utilizzati tre gruppi di sostanze: polimeri e copolimeri che legano l'acrilato, copolimeri dello stirene-butadiene-stirene (SBS) e copolimeri dell'etilen-vinil-acetato (EVA). I sistemi di legame a base di acqua sono quelli maggiormente utilizzati, ma sono stati anche trovati sistemi a base di adesivi in polvere, gomma piuma e, in alcuni casi, soluzioni di solventi organici. I prodotti polimerici possono essere depositati per spruzzatura, per impregnazione in bagno o in schiuma attiva, o mediante altri metodi impiegati nel finissaggio tessile; in quasi tutti i casi si deve ricorrere ad una successiva fase di essiccazione.

Il legame di tipo termico sfrutta le proprietà termoplastiche di alcune fibre sintetiche per la formazione di legami. In alcuni casi può essere usata la stessa rete fibrosa, ma spesso viene introdotta una fibra a bassa temperatura di fusione nella fase di formazione della rete per effettuare il legame in un secondo momento.

Nel legame meccanico, il consolidamento della rete è realizzato mediante aggrovigliamento fisico delle fibre. Ci sono due tipi di legame meccanico: agugliatura (*needlepunching*), processo che consiste nell'inserire ripetutamente nella rete aghi dotati di sporgenze che aiutano a catturare le fibre e permettono di spostarle da uno strato all'altro all'interno del non tessuto, e *spunlace (hydro-entanglement)*, processo applicato principalmente alle reti ottenute mediante cardatura o *wetlaid* che utilizza un getto d'acqua ad alta pressione per determinare il mescolamento delle fibre che si ridistribuiscono, intrecciandosi, lungo tutto lo spessore del non tessuto. La resistenza della rete dipende sia dalla pressione del getto d'acqua utilizzato, sia dal tipo di sistema. I TNT prodotti con tecnologia *spunlace* sono spesso utilizzati nel settore medico sotto forma di bavagli, camici, cuffie, copri-scarpe e teli per lettini monouso, essenziali per il mantenimento dell'asetticità in ambito ospedaliero.

Una volta terminato il processo di consolidamento della rete, mediante le opportune metodiche di legame, si passa alle procedure di finissaggio che permettono di modificare o aggiungere nuove proprietà al TNT attraverso l'utilizzo di differenti

sostanze chimiche o l'applicazione di differenti processi meccanici. Un TNT può essere reso conduttivo, ignifugo, idrorepellente, poroso, antistatico, traspirante o assorbente.

A questo punto il TNT completo è tagliato, piegato o cucito al fine di assumere il suo aspetto finale. In questo modo, la qualità, le proprietà ed il formato del TNT possono essere ulteriormente adeguati alle precise necessità permettendone un utilizzo estremamente ampio.

Applicazioni dei TNT si ritrovano in edilizia ed architettura, nei campi dell'arredamento, dell'abbigliamento medico e generico, in estetica e in agricoltura (EDANA - The international association serving the nonwovens and related industries).

Oggi un particolare tipo di TNT a base di fibre native di fibroina della seta (SilkTNT® - brevetto depositato il 21/3/2008, N. della domanda MI2008A000500), prodotto dalla ditta Sanitars S.p.a. attraverso la tecnologia *spunlace*, si presenta come potenziale candidato all'impiego per la produzione di garze e bendaggi innovativi per la cura di patologie cutanee, per lo studio e la progettazione di protesi impiantabili in chirurgia (ricostruzione addominale, legamenti e tendini) e per la preparazione di scaffold in pura fibroina nel settore dell'ingegneria tissutale, aprendo la strada alla produzione di scaffold su larga scala.

## SCOPO DEL LAVORO

L'ingegneria tissutale è una disciplina finalizzata all'ottenimento *in vitro* di tessuti o organi destinati all'impianto; l'obiettivo è quello di accelerare i processi di guarigione, rigenerare o addirittura sostituire i tessuti compromessi da patologie, sia di tipo degenerativo sia di origine traumatica. In questi ultimi anni si è assistito ad un grande sviluppo delle ricerche scientifiche in tale ambito, anche in risposta al crescente bisogno di tessuti e organi che le donazioni non sono in grado di soddisfare. La sfida dell'ingegneria tissutale risulta essere duplice: da un lato si tratta di individuare un supporto di tipo polimerico biodegradabile e biocompatibile, che promuova l'organizzazione tridimensionale delle cellule, dall'altro riprodurre le condizioni che consentano a queste ultime di crescere, moltiplicarsi e organizzarsi in un tessuto idoneo all'impianto.

La fibroina della seta, principale proteina ricavata dal bozzolo secreto dal *Bombyx mori*, grazie alle sue qualità di biocompatibilità, permeabilità all'ossigeno e al vapore acqueo e biodegradabilità viene considerata un ottimo biomateriale. Essa viene, infatti, largamente impiegata nella forma di fibra chimicamente rigenerata per ottenere una vasta gamma di strutture, quali film, membrane, idrogeli e spugne, utilizzate con successo per l'adesione e la crescita di differenti tipi cellulari, e nella sua forma di fibra nativa per ottenere fili da sutura, bendaggi per la cura di lesioni cutanee e patologie ulcerative, fibre filate per l'ingegneria del legamento crociato anteriore e reti non tessute per la coltura di osteoblasti, fibroblasti, epatociti e cheratinociti.

Un particolare impiego di fibre native di fibroina della seta è stato effettuato dalla ditta Sanitars S.p.a di Flero (Brescia) che ha prodotto, attraverso la tecnologia *spunlace*, un TNT a base di fibre native di fibroina della seta (SilkTNT® - brevetto depositato il 21/3/2008, N. della domanda MI2008A000500) che oggi si presenta come potenziale candidato all'impiego per la produzione di garze e bendaggi innovativi per la cura di patologie cutanee, per lo studio e la progettazione di protesi impiantabili in chirurgia (ricostruzione addominale, legamenti e tendini) e per la preparazione di scaffold in pura fibroina nel settore dell'ingegneria tissutale, aprendo la strada alla produzione di scaffold su larga scala.

In questo contesto, scopo della tesi è la caratterizzazione del SilkTNT® e lo studio del suo utilizzo come scaffold, attraverso l'allestimento di colture di cellule staminali mesenchimali estratte da tessuto adiposo (ADSC) e di insule pancreatiche isolate da donatore cadavere, per valutarne la potenzialità di impiego nell'ingegneria dei tessuti ed, in particolare, nel trapianto di insule pancreatiche per la cura del diabete mellito di tipo I.

# MATERIALI e METODI

## 1. Disegno dello studio

Il SilkTNT®, tessuto non tessuto a base di fibre native di fibroina della seta, è stato prodotto dalla ditta Sanitars S.p.a. di Flero (Brescia) con il metodo *spunlace*.

Tale tessuto non tessuto è stato caratterizzato mediante spettroscopia infrarossa con trasformata di Fourier (FT-IR), calorimetria differenziale a scansione modulare (DSC), microscopia ottica e microscopia elettronica a scansione (SEM); sono stati determinati, inoltre, la sua resistenza a trazione ed il suo allungamento.

Prima di essere impiegato come scaffold per le colture cellulari il SilkTNT® è stato sterilizzato con vapore saturo sotto pressione o con raggi  $\gamma$  ed in seguito sottoposto ad analisi mediante FT-IR e DSC.

Il SilkTNT® sterilizzato con vapore saturo sotto pressione, è stato impiegato come substrato nella coltura di cellule staminali derivate da tessuto adiposo (ADSC) e di insule pancreatiche isolate da donatore cadavere.

Le colture di ADSC, dopo fissazione, sono state analizzate con microscopia elettronica a scansione (SEM) e a trasmissione (TEM) per indagare l'entità dell'adesione cellulare e l'ultrastruttura delle cellule, mentre le colture di insule pancreatiche sono state analizzate con microscopia ottica.

## 2. Processo di produzione del SilkTNT®

Il SilkTNT® è stato prodotto e fornito dalla ditta Sanitars S.p.a. di Flero (Brescia).

Il processo di produzione del tessuto non tessuto comprende i seguenti stadi: (a) preparazione delle fibre; (b) creazione di una rete formata dalle suddette fibre; (c) interlacciatura della rete di fibre ottenuta nel precedente stadio per trattamento con acqua spruzzata ad alta pressione; (d) essiccamento del prodotto proveniente dallo stadio precedente.

Nello stadio (a) del processo si selezionano le fibre provenienti da bozzoli di seta vergine; si procede al taglio di tali fibre fino ad ottenere la lunghezza voluta ed al

relativo vaglio allo scopo di eliminare le impurezze solide; si procede quindi alla eliminazione della sericina attraverso un bagno di macerazione con acqua bidistillata a temperatura compresa tra 110 e 135°C ed a pressione compresa tra 2 e 10 atm per un'ora; si procede quindi alla rimozione del bagno di macerazione, ad una serie di lavaggi con acqua deionizzata alla temperatura di 60 °C e al successivo essiccamento ottenendo, quindi, una fibra priva di sericina. Dopo lo stadio di macerazione, la fibra asciugata è sottoposta a più fasi di parallelizzazione: la prima parallelizzazione è effettuata in una macchina definita “*nappeuse*”, costituita da due cilindri attraverso i quali il materiale introdotto passa sotto un tamburo rotante munito di aghi robusti e flessibili; questo sistema consente di aprire le fibre, di ottenere un primo allineamento delle stesse ed una prima eliminazione di fibre corte e materiali estranei. Le fasi successive di parallelizzazione sono effettuate mediante macchine (*dressing machines*) di derivazione laniera e servono a separare le fibre seriche in tre classi di lunghezza: la prima, denominata A1, con fibre di lunghezza compresa tra 61 e 70 mm, la seconda, denominata B2, con fibre di lunghezza compresa tra 45 e 58 mm, la terza, denominata C3, con fibre di lunghezza inferiore a 40 mm.

Il materiale di partenza, per ottenere il tessuto non tessuto, è costituito da fiocchi di seta A1, B2 e C3 in miscele con differenti rapporti quantitativi; i suddetti fiocchi, prima di essere sottoposti allo stadio (b), vengono tagliati in maniera tale che la lunghezza delle fibre sia inferiore a 40 mm.

Il prodotto finale proveniente dallo stadio (a), macerato, essiccato e parallelizzato, viene avviato alle successive fasi di lavorazione costituite dallo stadio (b).

Lo stadio (b) del processo comprende due stadi, ovvero il primo stadio (b1), che consiste nella fase di parallelizzazione conseguita tramite macchina cardatrice, ed un successivo stadio (b2) di disposizione della rete di fibre. Nella fase (b1) di parallelizzazione le fibre di seta vengono poste in ambiente ipersaturo di acqua, ovvero in una cardatrice situata in una camera in cui viene nebulizzata dell'acqua o una soluzione di sodio cloruro; infatti, poiché le fibre di fibroina possono caricarsi elettrostaticamente, è indispensabile realizzare tale fase in ambiente ipersaturo di acqua in maniera tale che le fibre assorbano acqua attorno al 10% del loro peso originale. Il secondo stadio (b2) consiste nella disposizione della rete su di un apposito nastro in modo regolare ed uniforme mediante applicazione di un flusso di aria.

Nello stadio (c) del processo l'interlacciatura del tessuto non tessuto viene realizzata spruzzando acqua a pressione compresa tra 100 e 180 bar. In questa fase l'eventuale sodio cloruro depositato nello stadio (b1) sulle fibre viene rimosso.

Lo stadio (d) di asciugatura del tessuto non tessuto viene realizzato a temperatura compresa tra 120 e 160°C.

Il tessuto non tessuto risultante presenta un peso/unità di superficie che può variare tra 20 g/m<sup>2</sup> e 500 g/m<sup>2</sup>.

### **3. Preparazione dei campioni di fibroina nativa e fibroina rigenerata utilizzati come confronto durante la caratterizzazione del SilkTNT®**

Seta proveniente da bozzoli di *Bombyx mori* è stata sgommata in autoclave con acqua bidistillata a 120 °C ed alla pressione di 2 bar per 1 h al fine di rimuovere la sericina dalla fibroina. Per completare il processo di rimozione, la seta sgommata è stata sottoposta a tre lavaggi con acqua deionizzata alla temperatura di 60°C ed è stata lasciata asciugare a temperatura ambiente per 36-48 h, ottenendo così il campione di fibroina nativa.

Per la preparazione del campione di fibroina rigenerata, seta proveniente da bozzoli di *Bombyx mori*, privata della sericina attraverso la procedura sopra descritta, è stata successivamente solubilizzata in una soluzione di Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>:MeOH (75:25 p/p) ponendola in bagno termostatico per 1 h a 65°C sotto agitazione ed in modo da ottenere una concentrazione di fibroina in soluzione pari al 5% p/v (Mathur AB et al, 1997). La soluzione di fibroina è stata posta a dializzare in acqua bidistillata per cinque giorni utilizzando membrane semipermeabili di acetato di cellulosa con *cut-off* di 12.400 Da. Al termine della dialisi la soluzione è stata recuperata, congelata a -20°C e quindi liofilizzata, ottenendo una spugna di fibroina rigenerata.

#### 4. Analisi del SilkTNT® mediante spettroscopia infrarossa con trasformata di Fourier (FT-IR)

Il SilkTNT® è stato analizzato mediante FT-IR su uno spettrometro Bruker Alpha (Fig. 6), munito della tecnica di riflessione totale attenuata (ATR) con interfaccia in cristallo di diamante e in cristallo di germanio, prima della sterilizzazione e dopo sterilizzazione tramite vapore saturo sotto pressione e raggi  $\gamma$ .

Gli spettri FT-IR in modalità trasmittanza sono stati ottenuti nella regione 4000-375  $\text{cm}^{-1}$ . Lo spettro di ogni campione, deposto sulla superficie del cristallo, è stato acquisito mediante la media di ventiquattro scansioni con una risoluzione di 4  $\text{cm}^{-1}$ .

Poiché lo strumento è a singolo raggio, prima di procedere con le analisi è stato effettuato il *background*, ovvero lo spettrofotometro ha eseguito un'analisi sul cristallo senza il campione.

Lo spettro FT-IR del SilkTNT® prima della sterilizzazione è stato confrontato con gli spettri FT-IR dei campioni di fibroina nativa e di fibroina rigenerata.

Gli spettri FT-IR dei campioni di SilkTNT® dopo sterilizzazione tramite vapore saturo sotto pressione e raggi  $\gamma$  sono stati confrontati con lo spettro FT-IR del SilkTNT® ottenuto prima della sterilizzazione.



Fig. 6: Spettrometro IR Bruker Alpha.

## 5. Analisi del SilkTNT® mediante calorimetria differenziale a scansione modulare (DSC)

Il SilkTNT® prima della sterilizzazione e dopo sterilizzazione tramite vapore saturo sotto pressione e raggi  $\gamma$  è stato analizzato mediante il calorimetro differenziale a scansione modulare Q<sub>200</sub> della TA Instruments (Fig. 7).

I campioni sono stati pesati su bilancia analitica Gibertini E50S/2 e da ciascuno è stata prelevata una quantità compresa tra 1,2 mg e 2,4 mg; ogni campione è stato quindi collocato negli appositi crogioli di alluminio. Il riscaldamento è stato effettuato in atmosfera inerte (N<sub>2</sub>) in un intervallo di temperatura tra 20°C e 500°C e con una velocità di riscaldamento di 10°C al minuto.

Il grafico DSC del SilkTNT® prima della sterilizzazione è stato confrontato con i grafici DSC dei campioni di fibroina nativa e di fibroina rigenerata.

I grafici DSC dei campioni di SilkTNT® dopo sterilizzazione tramite vapore saturo sotto pressione e raggi  $\gamma$  sono stati confrontati con il grafico DSC del SilkTNT® ottenuto prima della sterilizzazione.

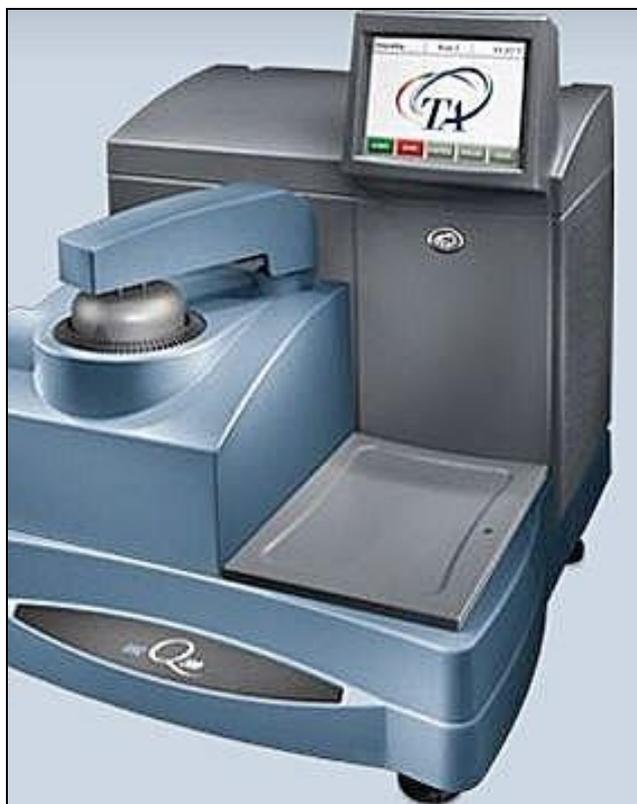


Fig. 7: Calorimetro differenziale a scansione modulare Q<sub>200</sub> della TA Instruments.

## 6. Analisi del SilkTNT® mediante microscopia ottica

Il SilkTNT® prima della sterilizzazione è stato analizzato al microscopio ottico Olympus BX51 con sistema di acquisizione digitale AnalySIS (Fig. 8).

Campioni di SilkTNT® sono stati sfibrati ed immersi in una soluzione di blu di *Coomassie* all'1% in H<sub>2</sub>O/EtOH (50:50) per 10 min. Successivamente i campioni sono stati lavati con acqua, per rimuovere il colorante in eccesso, e osservati al microscopio ottico per valutare la completa assenza di sericina sulle fibre, dal momento che il blu di *Coomassie* si lega preferenzialmente alle proteine caratterizzate da una struttura amorfa, quali appunto la sericina.

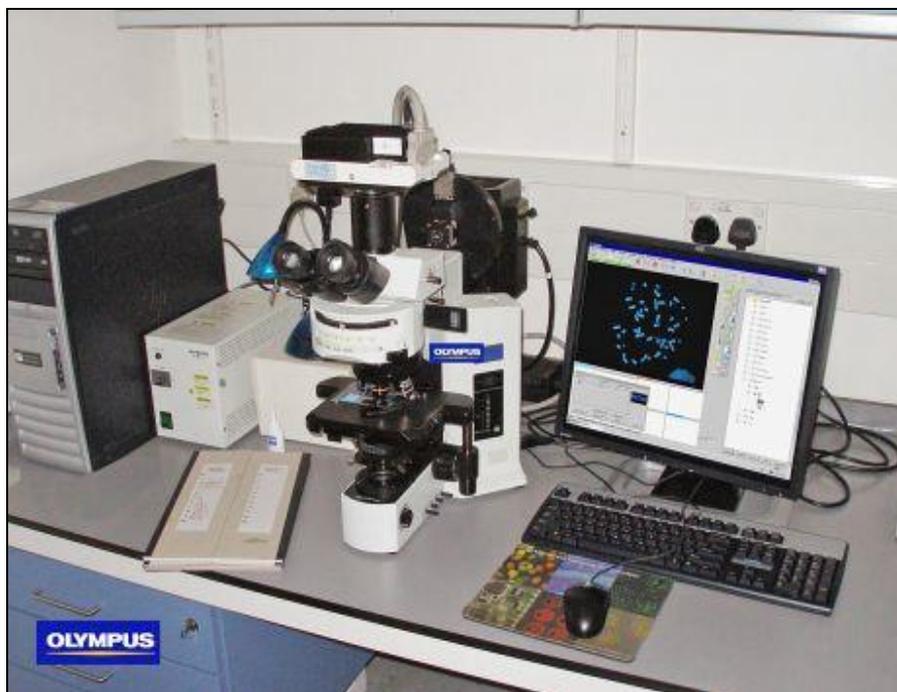


Fig. 8: Microscopio ottico Olympus BX51 con sistema di acquisizione digitale AnalySIS.

## 7. Analisi del SilkTNT®, prima e dopo coltura di ADSC, mediante microscopia elettronica a scansione (SEM)

Il SilkTNT® è stato analizzato con il microscopio elettronico a scansione JEOL JSM-6380LV (Fig. 9) (condizioni di lavoro: basso vuoto, 20kV, segnale a elettroni retro diffusi ed elettroni secondari) prima della sterilizzazione e dopo la coltura di ADSC.

L'esame morfologico, prima della sterilizzazione, è stato condotto su porzioni di SilkTNT® di circa 0,7 cm<sup>2</sup> poste su *stub* di alluminio. Inoltre, il microscopio elettronico accoppiato al sistema di micro-analisi IXRF Systems 500 Digital Processing è stato utilizzato per effettuare una *Energy Dispersive X-Ray Analysis* (EDX) del SilkTNT®. La metodica analitica EDX sfrutta i raggi X emessi da un campione, colpito da un fascio accelerato di elettroni, per la caratterizzazione qualitativa e l'analisi elementare dello stesso. Nel caso del SilkTNT®, tale analisi è stata effettuata allo scopo di verificare l'assenza di eventuali tracce di metalli pesanti, la cui presenza potrebbe derivare dal contatto delle fibre di fibroina con gli aghi flessibili della macchina cardatrice nelle operazioni di parallelizzazione.

Per eseguire l'analisi del SilkTNT® dopo coltura, le cellule sono state sottoposte a fissazione. Le soluzioni necessarie per la fissazione sono tre: glutaraldeide al 2% in DMEM (fissativo 1), glutaraldeide al 2% in tampone cacodilato 0,1 M (fissativo 2), tampone cacodilato 0,1 M (fissativo 3).

Il terreno di coltura è stato rimosso ed i campioni sono stati lavati due volte con il fissativo 1, poi immersi in quest'ultimo per 30 minuti a temperatura ambiente. Successivamente il fissativo 1 è stato rimosso ed è stato aggiunto il 2, i campioni in questo caso sono stati lasciati immersi 30 minuti a 4 °C. Eliminato il fissativo 2 i campioni sono stati lavati più volte col fissativo 3. Come ultimo passaggio il tampone cacodilato è stato rimosso ed i campioni immersi in soluzioni di etanolo/acqua a concentrazioni crescenti di alcool (30%, 50%, 70%, 90%, 100%), 15 minuti per ciascun passaggio e ripetendo due volte quello in etanolo al 100%, sempre a temperatura ambiente. Eliminato l'etanolo, i campioni di SilkTNT® sono stati collocati su *stub* di alluminio ed analizzati nelle condizioni di lavoro precedentemente descritte.



Fig. 9: Microscopio elettronico a scansione JEOL JSM-6380LV con sistema di micro-analisi IXRF Systems 500 Digital Processing.

## **8. Determinazione della resistenza a trazione e dell'allungamento del SilkTNT®**

La determinazione della resistenza alla trazione e dell'allungamento del SilkTNT® è stata effettuata utilizzando l'apparecchiatura Instron 5500R (Fig. 10). Per l'analisi è stato scelto un campione di SilkTNT® con peso/unità di superficie di  $152 \text{ g/m}^2$ . Il campione di SilkTNT® è stato analizzato sia con orientamento "macchina", ovvero con orientamento parallelo all'avanzamento del fronte del SilkTNT® durante il processo di produzione, sia con orientamento "trasversale", ovvero con orientamento perpendicolare all'avanzamento del fronte del SilkTNT® durante il processo di produzione. Per entrambi gli orientamenti, i campioni impiegati possedevano dimensioni di 30 cm x 5 cm. Ciascun campione è stato posizionato tra due morsetti distanziati 20 cm. Le analisi sono state condotte in camera condizionata a  $20^\circ\text{C}$  e 60% di umidità. È stata applicata una velocità costante di allungamento di 10 cm/min. Per ciascun campione sono state effettuate cinque repliche. I risultati sono espressi come

massimo carico a rottura, in newton (N), e come allungamento a massimo carico, espresso come percentuale della lunghezza nominale (distanza iniziale tra i morsetti) a rottura.

I dati grezzi sono stati sottoposti al test di Kolmogorov-Smirnov per valutare la resistenza alla trazione e l'allungamento in funzione dell'orientamento del SilkTNT®. I risultati sono espressi come mediana, valore minimo e valore massimo. La significatività statistica è stata considerata con  $p=0.05$ . Le analisi sono state condotte utilizzando il programma Past 2.01.



Fig. 10: Apparecchiatura per prova di trazione Instron 5500R.

## 9. Sterilizzazione del SilkTNT®

Il SilkTNT® prima della coltura cellulare è stato sottoposto a sterilizzazione con vapore saturo sotto pressione e raggi  $\gamma$ .

La sterilizzazione con vapore saturo è stata effettuata mediante autoclave Systec V-65 effettuando un ciclo di sterilizzazione a 121°C per 20 minuti con tempo di asciugatura di 10 minuti.

La sterilizzazione con raggi  $\gamma$ , alle dosi di 20, 40 e 60 kGy, è stata gentilmente eseguita dalla Gammatom S.r.l. di Guanzate (CO). I campioni di SilkTNT® sterilizzati in

autoclave e con raggi  $\gamma$  sono stati in seguito sottoposti ad una prova microbiologica di sterilità e a caratterizzazione mediante DSC e spettroscopia FT-IR.

Per la prova di sterilità i campioni di SilkTNT® sono stati incubati per sette giorni in DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*). Al termine del tempo previsto è stata prelevata un'aliquota di 5 mL e inoculata in flacone BacT/ALERT per il rilevamento di microrganismi aerobi e anaerobi facoltativi. Il metodo è completamente automatizzato e si basa sulla tecnologia BacT/ALERT® 3D brevettata da BioMérieux S.p.a., la quale è in grado di rilevare la presenza di microrganismi tracciando la loro produzione di CO<sub>2</sub>: all'aumentare della concentrazione di CO<sub>2</sub> il sensore nel flacone vira al giallo e, misurando la luce riflessa, il BacT/ALERT 3D verifica e registra i cambiamenti di colore del sensore. I dati così ricevuti vengono analizzati da un algoritmo che ne determina la positività.

## **10. Isolamento e coltura di cellule staminali da tessuto adiposo (ADSC)**

Il tessuto adiposo sottocutaneo da donatore è stato ottenuto mediante la tecnica della liposuzione. Al fine di isolare la frazione stromale, il tessuto adiposo sottocutaneo è stato sminuzzato, sottoposto a lavaggi con *phosphate buffered saline* (PBS) e posto in digestione con collagenasi per 45 minuti a 37°C. Una volta avvenuta la separazione della componente lipidica e inattivato l'enzima con terreno di coltura, il tessuto digerito è stato centrifugato a 300 g per 10 minuti (Zuk PA et al, 2002). Dopo aver rimosso il surnatante, per eliminare le gocce lipidiche residue, i frammenti non digeriti e le tracce di sangue, il *pellet* è stato sottoposto a due lavaggi mediante risospensione in PBS e centrifugazione. La vitalità e la concentrazione cellulare sono state determinate con *Trypan blue* in camera di Burker.

La frazione stromale ottenuta è stata seminata alla densità di 100.000 cellule/cm<sup>2</sup> in fiasche contenenti il medium di coltura, cambiato ogni 72 ore fino alla semiconfluenza (P0); la densità di semina per tutti i passaggi successivi (P1 – P3) è stata di 10.000 cellule/cm<sup>2</sup>. Per gli esperimenti sono state utilizzate cellule a P3. Il medium di coltura delle staminali è definito ADSC-MEM (Minimum Essential Medium) ed è composto da *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) ed F12 in rapporto 1:1, siero fetale bovino, penicillina, streptomina e anfotericina B.

Porzioni di SilkTNT® da 1 cm<sup>2</sup>, sterilizzate in autoclave e risultate sterili dopo test di sterilità, sono state seminate con 40.000 cellule/cm<sup>2</sup>. Le cellule sono state mantenute in coltura per 15 giorni con sostituzione del medium ogni 2 giorni.

## **11. Analisi del SilkTNT® dopo coltura di ADSC mediante microscopia elettronica a trasmissione (TEM)**

I campioni di SilkTNT® dopo la coltura di ADSC sono stati tagliati in pezzi da 1 mm<sup>3</sup> ed immersi per 90 minuti in una miscela costituita da glutaraldeide al 2,5% e cacodilato sodico 0,1 M tamponata a pH 7,4; le cellule sono state poi ulteriormente fissate per altri 90 minuti con osmio tetrossido allo 0,1% nello stesso tampone a temperatura ambiente. La disidratazione è stata effettuata con una scala di alcoli da 25° a 100°, ogni passaggio per 15 minuti tranne l'ultimo passaggio a 100° per 30 minuti. Ciascun campione è stato poi immerso in ossido di propilene e resina in rapporto 2:1, 1:1 e 1:2, ciascun passaggio per 30 minuti ed infine in resina *overnight*. In seguito ogni campione è stato incluso in Epon 812/Araldite; la resina è stata polimerizzata in termostato a 58°C. Le inclusioni sono state piramidate e sezionate con ultramicrotomo (Ultracut S Ultramicrotome, Reichert).

Le sezioni semifini (1-2 µm), colorate con blu di toluidina, sono state analizzate al microscopio ottico Olympus BX51 per visualizzarne l'istologia. Le sezioni ultrafini (600 Å) sono state montate su retini di nickel da 200 Mesh e successivamente colorate con sali di metalli pesanti (acetato di uranile e citrato di piombo). Le analisi ultrastrutturali sono state effettuate con il microscopio elettronico a trasmissione JEOL JEM 1200 EX (Fig. 11) operante a 80kV.



Fig. 11: Microscopio elettronico a trasmissione JEOL JEM 1200 EX.

## **12. Isolamento e coltura di insule pancreatiche da donatore cadavere**

In collaborazione con la Struttura Semplice di Terapia Tissutale dell'Ospedale Niguarda Ca' Granda di Milano, che collabora ormai da anni con il Diabetes Research Institute di Miami (Florida - USA), sono state analizzate le potenzialità del SilkTNT® quale scaffold tridimensionale per l'adesione di insule pancreatiche isolate da pancreas di donatori deceduti.

Le insule sono state isolate, secondo la metodica di Ricordi (Ricordi C et al, 1988), da pancreas provenienti da donatori con Indice di Massa Corporea (BMI) non superiore a 28 e di età compresa tra i 15 e i 60 anni.

L'organo è stato inizialmente separato dal tessuto adiposo circostante, dalla milza e dalla porzione di duodeno.

Attraverso un'incisione effettuata al centro della ghiandola è stato raggiunto il dotto pancreatico principale e sono state inserite due cannule per consentire l'iniezione di una soluzione fredda (~4°C) di collagenasi. L'infusione della soluzione di collagenasi attraverso le due cannule è stata realizzata mediante una pompa peristaltica che infonde la soluzione enzimatica a una pressione massima di 180 mmHg.

L'organo è stato quindi tagliato in 8-10 pezzi e collocato nella camera di dissociazione. Tale camera è la componente chiave del circuito di dissociazione ed è costituita da una porzione inferiore, dove viene collocato il pancreas insieme a sfere metalliche, e da una porzione superiore, costituita da un imbuto capovolto, separate da un filtro metallico con *cut off* a 500 µm: la fase digestiva consiste nella combinazione dell'effetto enzimatico, ottenuto tramite l'aumento della temperatura, e meccanico, generato dall'azione delle sfere durante l'agitazione della camera; il risultato è la liberazione di frammenti di pancreas in grado di passare attraverso il filtro metallico grazie al flusso unidirezionale del fluido di dissociazione. Il processo di digestione termina quando la maggior parte delle isole sono libere dal tessuto esocrino, quindi l'attività enzimatica viene bloccata attraverso l'abbassamento della temperatura e l'aggiunta di albumina sierica umana.

Il tessuto digerito è stato raccolto e sospeso nella *University of Wisconsin solution* (soluzione UW). Tale soluzione aumenta la densità del tessuto esocrino producendo una differenza di densità più netta tra le frazioni endocrina ed esocrina del tessuto digerito e migliorando così l'efficacia della separazione mediante gradiente di densità. Dopo precipitazione, il tessuto è stato caricato su un gradiente di densità continuo (Biocoll), posto in un processore COBE 2991 e centrifugato a 1.800 giri/min per 10 minuti; il processore viene raffreddato a 4°C durante questa procedura per evitare che l'attività enzimatica residua danneggi l'integrità strutturale delle isole e per proteggere le cellule dalla tossicità del gradiente.

Al completamento della separazione in gradiente di densità, il tessuto è stato raccolto in aliquote con diversi rapporti isole/porzione esocrina. Le isole sono contenute nella porzione meno densa del gradiente; le aliquote iniziali, recuperate dal COBE, contengono, infatti, isole altamente purificate, mentre con l'aumentare della densità del gradiente la presenza di tessuto esocrino è sempre più consistente. Le aliquote contenenti isole con un grado di purezza compreso tra il 70-90% sono state mantenute in coltura con medium 199, opportunamente addizionato, in incubatore umidificato, a 24°C e 5% di CO<sub>2</sub>.

Per la semina su SilkTNT® sono state utilizzate isole con non più di tre giorni di coltura, al fine di ridurre la perdita di vitalità: porzioni di SilkTNT® di 1 cm<sup>2</sup>, sterilizzate in autoclave e risultate sterili dopo test di sterilità, sono state seminate con

30.000 Ieq (isole equivalenti) risospese in 100  $\mu$ L di medium. Dopo un giorno, le colture sono state fotografate al microscopio ottico Olympus BX51 con ingrandimenti 10X e 20X.

## RISULTATI e DISCUSSIONE

Il SilkTNT® è stato caratterizzato mediante spettroscopia infrarossa con trasformata di Fourier, calorimetria differenziale a scansione, microscopia ottica e microscopia elettronica a scansione accoppiata a sistema di micro-analisi (EDX).

Le analisi effettuate mediante spettroscopia FT-IR dimostrano che il processo di produzione del SilkTNT® non produce alcun effetto, dal punto di vista conformazionale, sulle fibre di fibroina nativa che compongono il non tessuto (Figg. 12 e 13); considerando, infatti, l'assorbimento relativo all'ammide I nello spettro FT-IR del SilkTNT® si nota la presenza del picco a  $1619\text{ cm}^{-1}$ , posizione tipicamente correlata alla conformazione *silk II* e cioè alla predominante struttura a foglietto  $\beta$  antiparallelo delle molecole di fibroina che compongono le fibre e che assicura il mantenimento delle eccezionali proprietà meccaniche di questa proteina. Il confronto di tale spettro con lo spettro FT-IR di fibroina nativa dopo sgommatura e di fibroina rigenerata, attraverso liofilizzazione, sotto forma di spugna conferma quanto osservato in precedenza; si nota, infatti, come il picco di assorbimento relativo all'ammide I della fibroina nativa si posizioni anch'esso nella regione dello spettro intorno a  $1620\text{ cm}^{-1}$  e come, invece, il picco di assorbimento relativo all'ammide I nello spettro FT-IR del campione di fibroina rigenerata si posizioni a  $1635\text{ cm}^{-1}$ , numero d'onda che conferma come la conformazione a  $\beta$ -sheet antiparallelo della proteina non sia più la predominante, ma esista un maggior contributo in strutture amorfe.

L'analisi con calorimetria differenziale a scansione modulare fornisce ulteriori dati sulla conformazione della fibroina nel SilkTNT®. Nella Fig. 14 sono mostrati i termogrammi ottenuti con l'analisi DSC del campione di SilkTNT®, di un campione di fibroina nativa sgommata e di un campione di fibroina rigenerata: come è possibile osservare, il termogramma del SilkTNT® mostra lo stesso andamento del termogramma ottenuto con l'analisi del campione di fibroina nativa; il picco endotermico di degradazione della fibroina risulta, infatti, posizionato alla temperatura di  $\sim 320^\circ\text{C}$  in entrambi i termogrammi, indicando come anche la fibroina che compone il SilkTNT® possieda la prevalente conformazione *silk II* caratteristica della proteina nativa e confermando quanto verificato dalle precedenti analisi con spettroscopia

infrarossa. Il campione di fibroina rigenerata mostra, al contrario, il comportamento tipico della fibroina con conformazione *silk I*; nel termogramma si osserva, infatti, lo *shift* endotermico a 179°C, corrispondente alla temperatura di transizione vetrosa ( $T_g$ ) della fibroina, il picco esotermico a 210°C, corrispondente alla sua temperatura di cristallizzazione ( $T_c$ ) ed il picco endotermico a 288°C, corrispondente alla temperatura di degradazione della proteina con una maggior percentuale di strutture amorfe. Tali dati concordano con quanto verificato da Magoshi et al. nel loro studio del 1975.

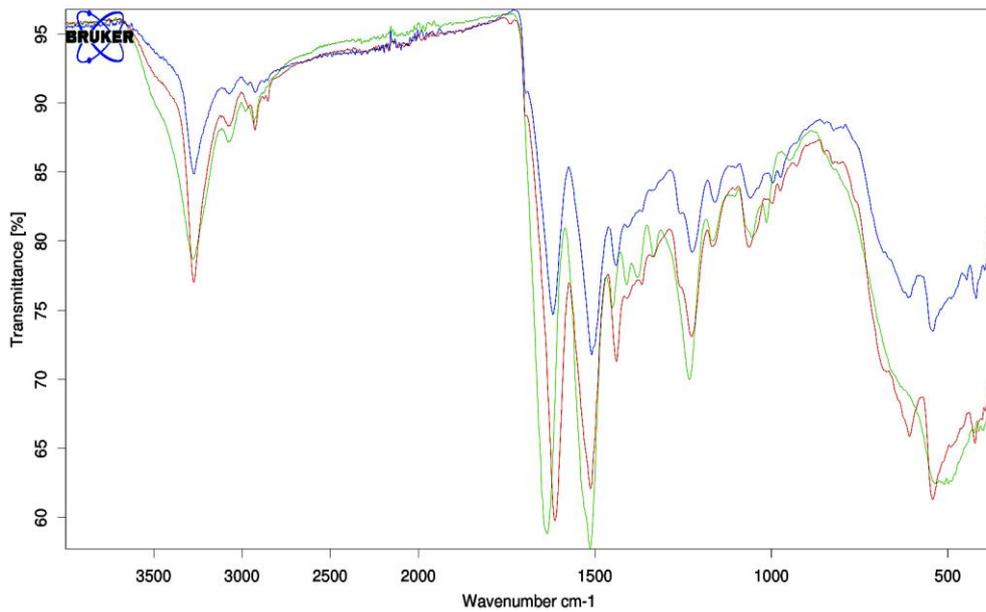


Fig. 12: Spettri FT-IR di SilkTNT® (blu), fibroina nativa (rosso) e fibroina rigenerata (verde).

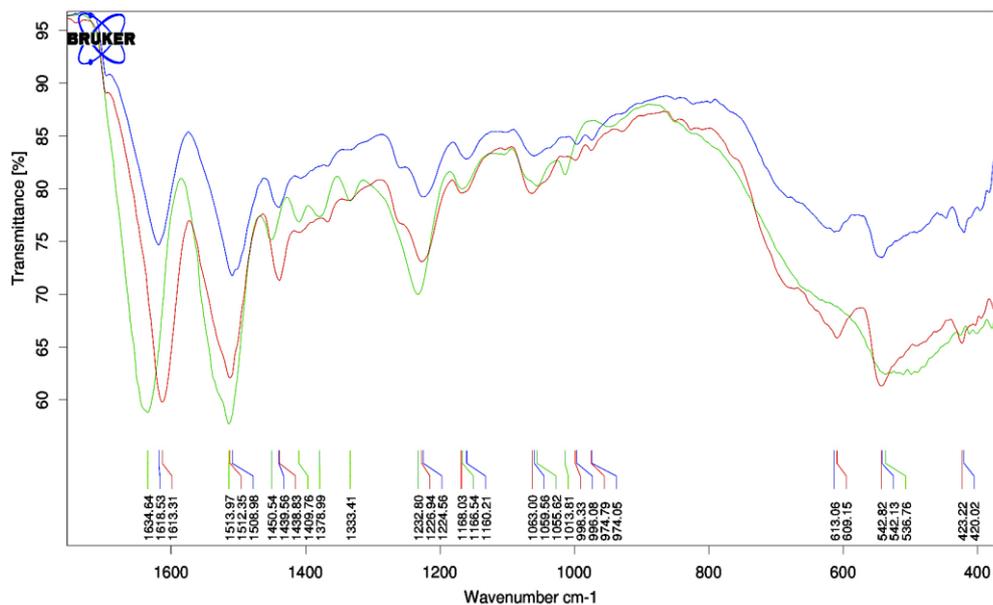


Fig. 13: Particolare spettri FT-IR di SilkTNT® (blu), fibroina nativa (rosso) e fibroina rigenerata (verde).

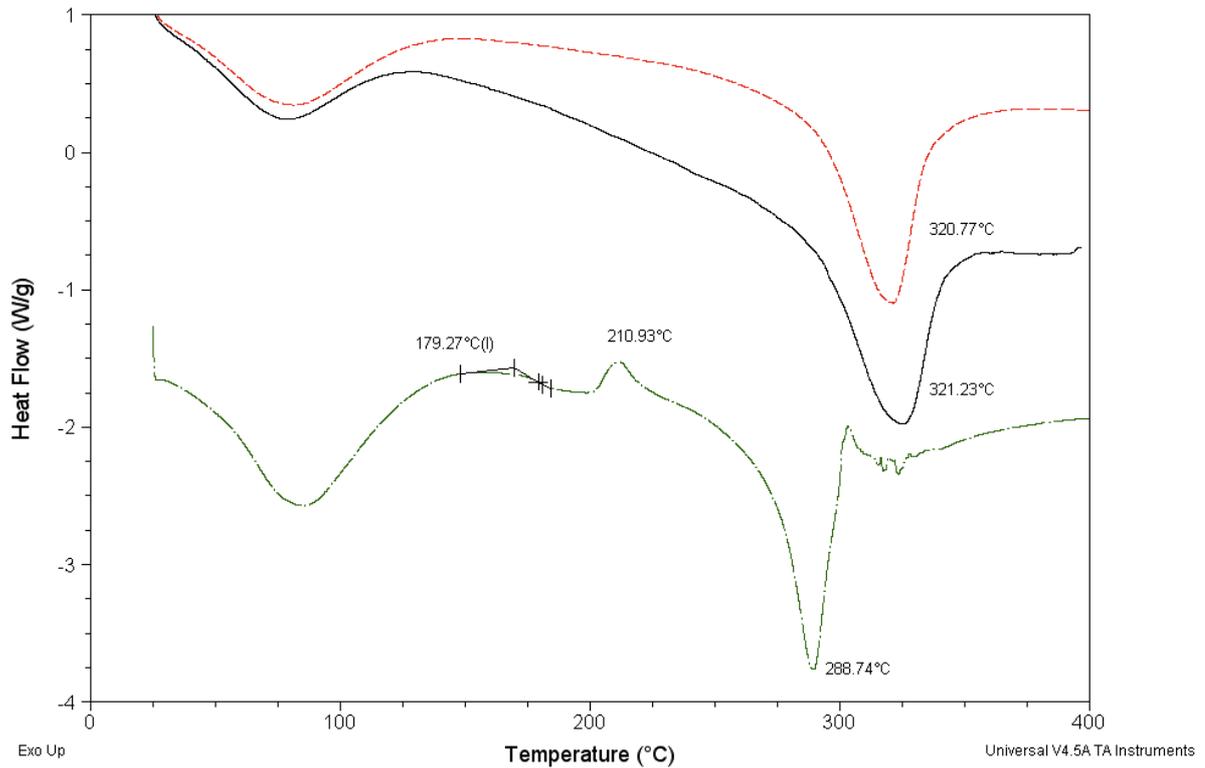


Fig. 14: Termogrammi ottenuti con l'analisi DSC del SilkTNT® (nero), di un campione di fibroina nativa (rosso) e di un campione di fibroina rigenerata (verde).

Il SilkTNT® è stato caratterizzato anche mediante un'analisi qualitativa al microscopio ottico per verificare la completa rimozione della sericina dalle fibre di fibroina, che avviene durante il processo produttivo.

Per verificare l'assenza di sericina campioni di SilkTNT® sono stati sfibrati e colorati con una soluzione di blu di *Coomassie*, colorante specifico per le proteine che colora sia la fibroina sia la sericina. La sericina, proteina amorfa e idrofila, possiede una maggior tendenza ad assorbire acqua e a trattenere il colorante anche dopo decolorazione rispetto alla fibroina. L'eventuale presenza di sericina viene, quindi, identificata per la presenza di agglomerati colorati di blu intenso lungo le fibre di fibroina. Come mostrato in Fig. 15, le fibre di fibroina del SilkTNT® risultano totalmente prive di sericina.

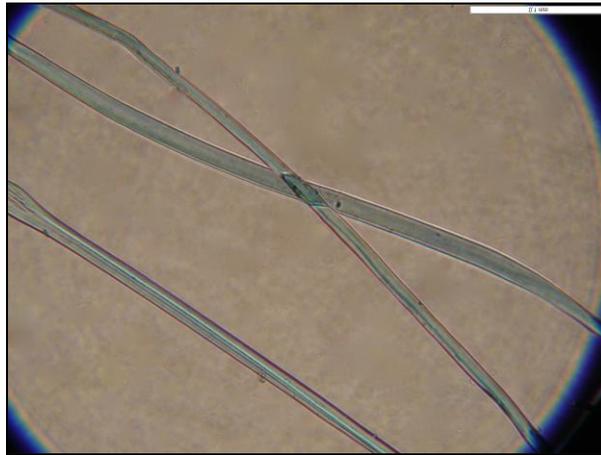


Fig. 15: Fotografia al microscopio ottico di fibre di fibroina derivate dal SilkTNT® dopo colorazione con blu di *Coomassie*.

Un'analisi morfologica è stata effettuata sul SilkTNT® mediante microscopia elettronica a scansione. La Fig. 16 mostra, con ingrandimenti differenti, la struttura tridimensionale del non tessuto, la morfologia delle fibre di fibroina che lo compongono e la loro purezza.

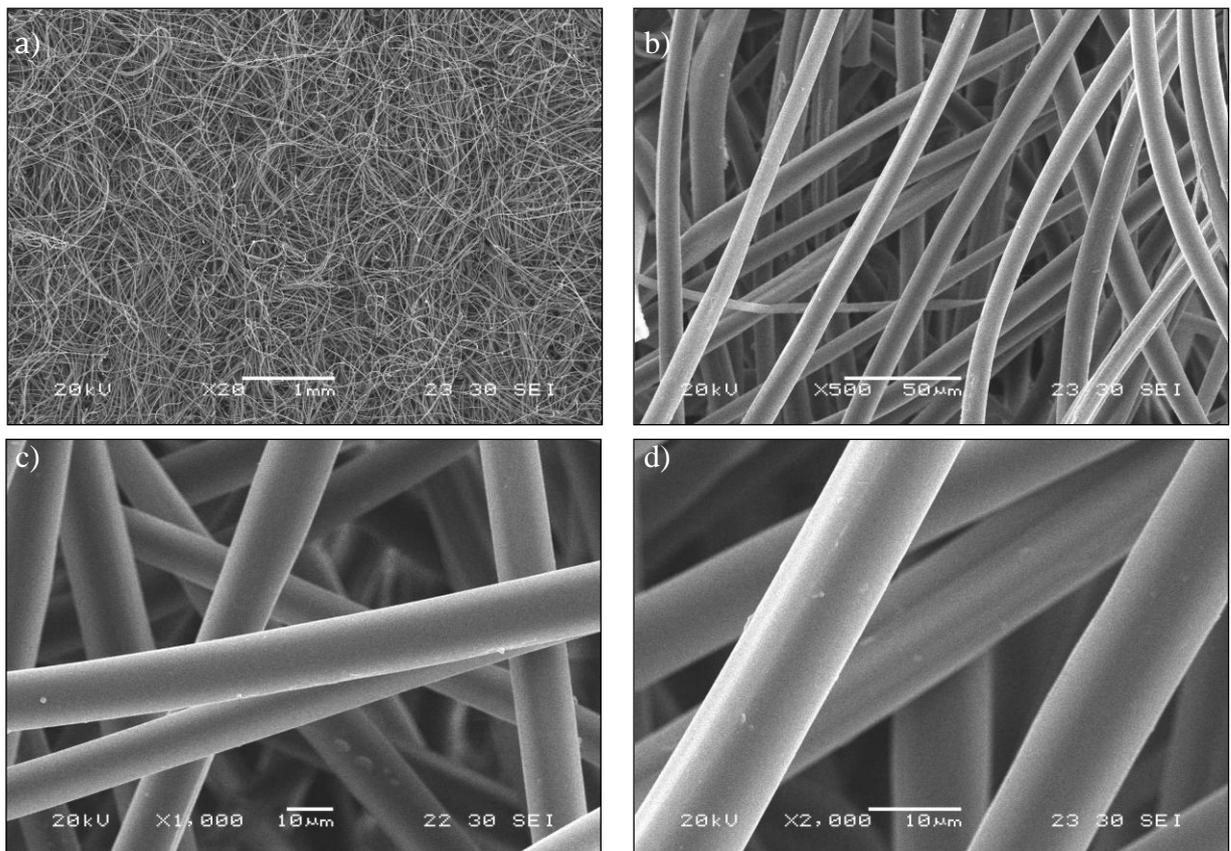


Fig. 16: Fotografie al microscopio elettronico a scansione (SEM) del SilkTNT®: a) ingrandimento 20X, b) ingrandimento 500X, c) ingrandimento 1000X, d) ingrandimento 2000X.

Il microscopio elettronico a scansione accoppiato ad un sistema di micro-analisi è stato inoltre utilizzato per condurre sul SilkTNT® una *Energy Dispersive X-Ray Analysis* (EDX). Il risultato dell'analisi, mostrato in Fig. 17, conferma l'assenza di metalli tra le fibre del SilkTNT® evidenziando la presenza di elementi chimici quali carbonio (C), ossigeno (O) e zolfo (S), principali costituenti delle proteine, come elementi predominanti nella composizione del non tessuto.

La tecnologia di produzione *spunlace* si dimostra quindi in grado di garantire un elevato grado di purezza e risulta, pertanto, ottimale per la produzione di tessuti non tessuti destinati all'ambito sanitario e biomedicale.

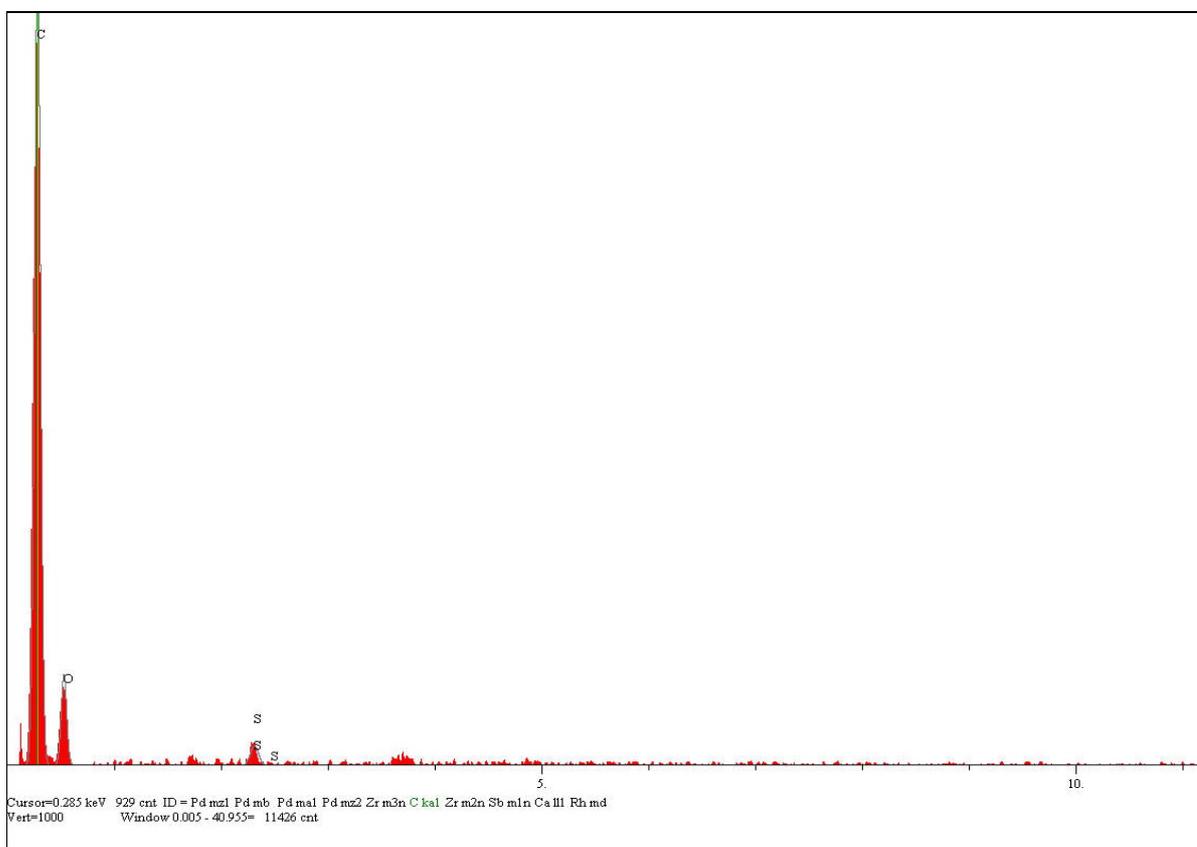


Fig. 17: Spettro derivato dall'analisi EDX del SilkTNT®.

Il SilkTNT® è stato caratterizzato anche attraverso prove di resistenza a trazione e di allungamento. Per le prove di trazione e allungamento è stato scelto un SilkTNT® con peso/unità di superficie di 152 g/m<sup>2</sup>. Le analisi effettuate sui campioni di SilkTNT® con orientamento “macchina”, ovvero con orientamento parallelo all'avanzamento del fronte del non tessuto nel processo di produzione, hanno prodotto i risultati riportati in Tabella 4 e in Fig. 18; per problemi di carattere tecnico, legati alle difficoltà

nell'ancoraggio di uno dei campioni tra i morsetti dello strumento utilizzato per le analisi, sono stati acquisiti i dati relativi a quattro campioni su cinque.

Tabella 4: Risultati delle prove di trazione e di allungamento dei campioni di SilkTNT® con orientamento “macchina”.

<i>Campioni SilkTNT®</i>	<i>Massimo carico a rottura (N)</i>	<i>Allungamento a massimo carico (%)</i>
<i>Campione 1</i>	297,92	35,62
<i>Campione 2</i>	276,11	35,36
<i>Campione 3</i>	247,48	30,3
<i>Campione 4</i>	293,43	29,82
<i>Media</i>	<b>278,73</b>	<b>32,77</b>
<i>Deviazione standard (SD)</i>	22,86	3,14
<i>Deviazione standard relativa (RSD)</i>	8,2	9,6

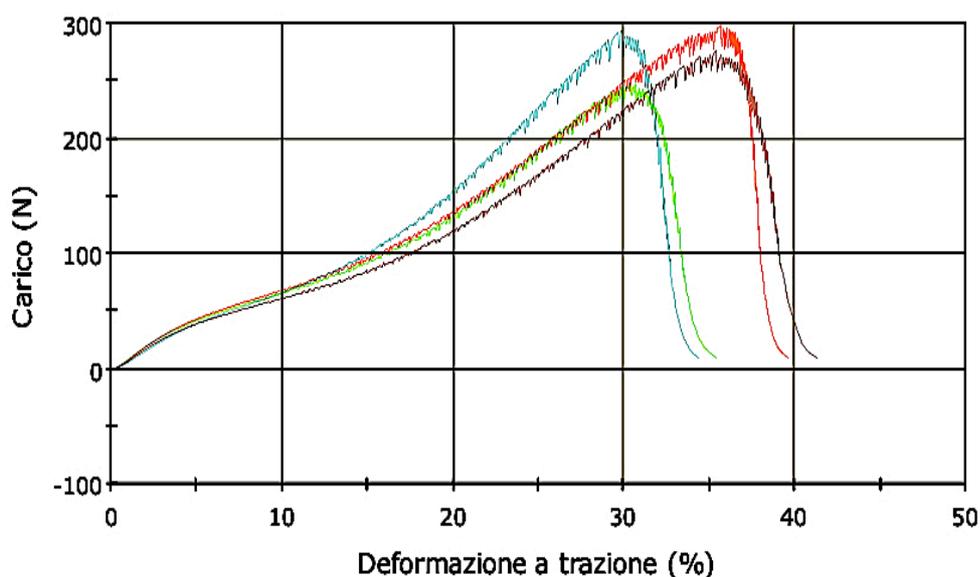


Fig. 18: Curva forza-allungamento di quattro campioni di SilkTNT® con orientamento “macchina”.

Il carico massimo medio sopportato dai campioni di SilkTNT® con orientamento “macchina” è risultato essere di 278,73 N, mentre l’allungamento massimo medio, espresso come percentuale della lunghezza nominale originaria (20 cm), è risultato essere del 32,77%.

Le prove di trazione e allungamento effettuate sui campioni di SilkTNT® con orientamento “trasversale”, ovvero con orientamento perpendicolare all’avanzamento

del fronte del non tessuto nel processo di produzione, hanno prodotto i risultati riportati in Tabella 5 e in Fig. 19.

Tabella 5: Risultati delle prove di trazione e di allungamento dei campioni di SilkTNT® con orientamento “trasversale”.

<i>Campioni SilkTNT®</i>	<i>Massimo carico a rottura (N)</i>	<i>Allungamento a massimo carico (%)</i>
<i>Campione 1</i>	125,21	51,13
<i>Campione 2</i>	158,91	53,03
<i>Campione 3</i>	197,54	55,71
<i>Campione 4</i>	184,68	58,02
<i>Campione 5</i>	181,5	59
<i>Media</i>	<b>169,57</b>	<b>55,38</b>
<i>Deviazione standard (SD)</i>	28,44	3,31
<i>Deviazione standard relativa (RSD)</i>	16,77	5,98

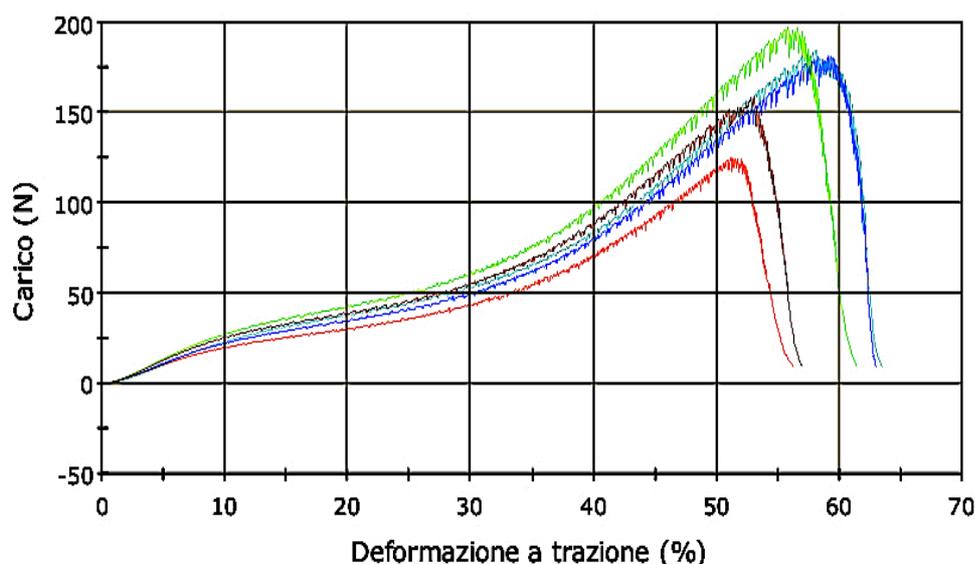


Fig. 19: Curva forza-allungamento di cinque campioni di SilkTNT® con orientamento “trasversale”.

Il carico massimo medio sopportato dai campioni di SilkTNT® con orientamento “trasversale” è risultato essere di 169,57 N, mentre l’allungamento massimo medio, espresso come percentuale della lunghezza nominale originaria (20 cm), è risultato essere del 55,38%.

I dati grezzi sono stati sottoposti al test di Kolmogorov-Smirnov per valutare la resistenza alla trazione e l’allungamento in funzione dell’orientamento del SilkTNT® (Tabella 6). La significatività statistica è stata considerata con  $p=0,05$ .

Tabella 6: Risultati del test di Kolmogorov-Smirnov.

	<i>SilkTNT</i> <sup>®</sup> (g/m <sup>2</sup> )	<i>Orientamento</i>	<i>Mediana</i>	<i>Minimo</i>	<i>Massimo</i>	<i>p</i>
<i>Massimo carico a rottura (N)</i>	152	Macchina	284,77	247,48	297,92	0,0069
	152	Trasversale	181,50	125,21	197,54	
<i>Allungamento a massimo carico (%)</i>	152	Macchina	32,83	29,82	35,62	0,0069
	152	Trasversale	55,71	51,13	59,00	

I risultati riportati in Tabella 6 indicano che l'orientamento del SilkTNT<sup>®</sup> influenza in modo significativo ( $p=0,0069$ ) la resistenza alla trazione e l'allungamento del non tessuto.

I dati di resistenza a trazione e di allungamento ottenuti sono estremamente incoraggianti poiché il carico massimo medio sopportato dai campioni di SilkTNT<sup>®</sup> con orientamento "macchina" risulta paragonabile al carico ciclico fisiologico di 300 N a cui è sottoposto il legamento crociato anteriore umano (Vunjak-Novakovic G et al, 2004) e aprono la strada al possibile utilizzo del SilkTNT<sup>®</sup> nel disegno di protesi per l'ingegneria dei legamenti.

Per il successivo utilizzo come supporto per colture cellulari, è fondamentale che il SilkTNT<sup>®</sup> sopporti un processo di sterilizzazione. In questo studio sono state impiegate due differenti metodiche di sterilizzazione, ovvero vapore saturo sotto pressione e raggi  $\gamma$ , che hanno prodotto simili risultati.

I campioni di SilkTNT<sup>®</sup> sterilizzati con vapore saturo sotto pressione hanno dimostrato di sopportare bene la sterilizzazione e hanno inoltre superato il test di sterilità effettuato tramite il sistema BacT/ALERT.

L'analisi FT-IR del SilkTNT<sup>®</sup> dopo sterilizzazione in autoclave conferma che il processo non causa fenomeni di degradazione nella fibroina che lo compone. Confrontando, infatti, gli spettri FT-IR del SilkTNT<sup>®</sup> ottenuti prima e dopo sterilizzazione in autoclave (Figg. 20 e 21) è possibile osservare come tali spettri risultino identici e come la fibroina mantenga la struttura *silk II* anche in seguito al processo; entrambi gli spettri, infatti, presentano picchi di assorbimento relativi all'ammide I nella regione dello spettro elettromagnetico intorno a 1620 cm<sup>-1</sup>.

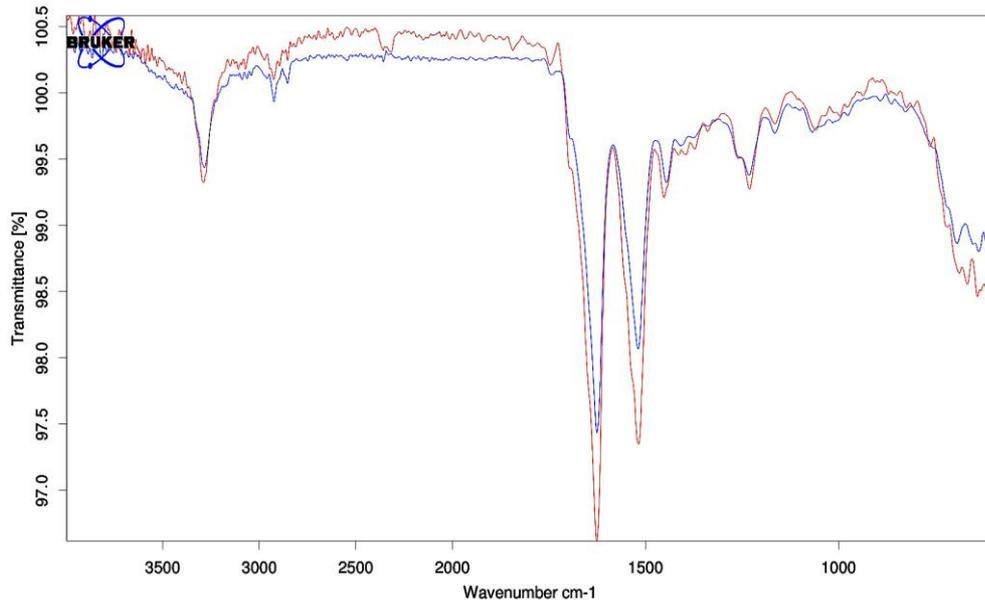


Fig. 20: Spettri FT-IR del SilkTNT® prima (rosso) e dopo (blu) sterilizzazione con vapore saturo sotto pressione.

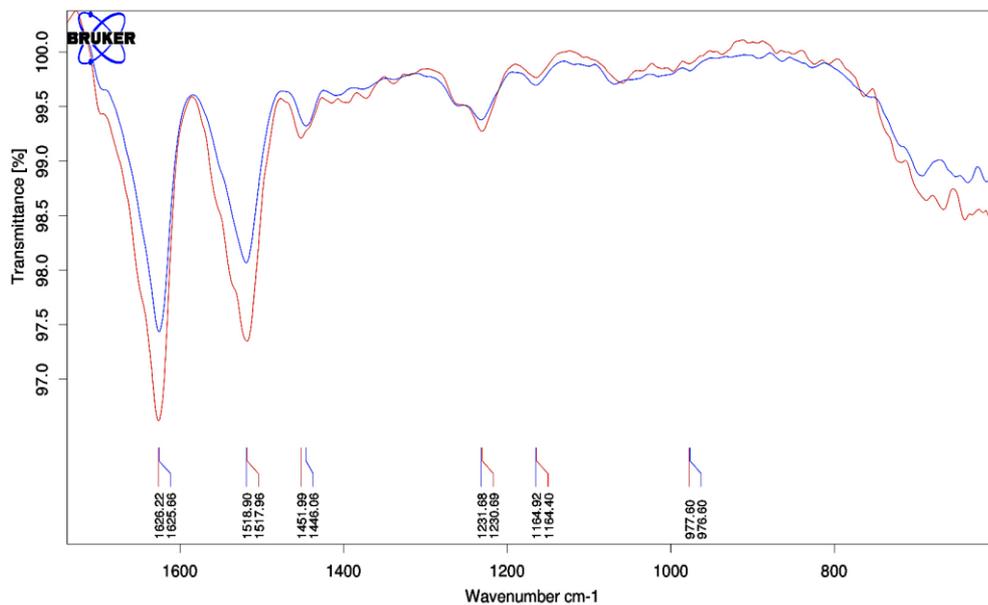


Fig. 21: Particolare spettri FT-IR del SilkTNT® prima (rosso) e dopo (blu) sterilizzazione con vapore saturo sotto pressione.

Anche i termogrammi ottenuti con l'analisi DSC del SilkTNT® prima e dopo sterilizzazione in autoclave, riportati in Fig. 22, dimostrano come il processo non influisca in alcun modo sulla struttura della fibroina.

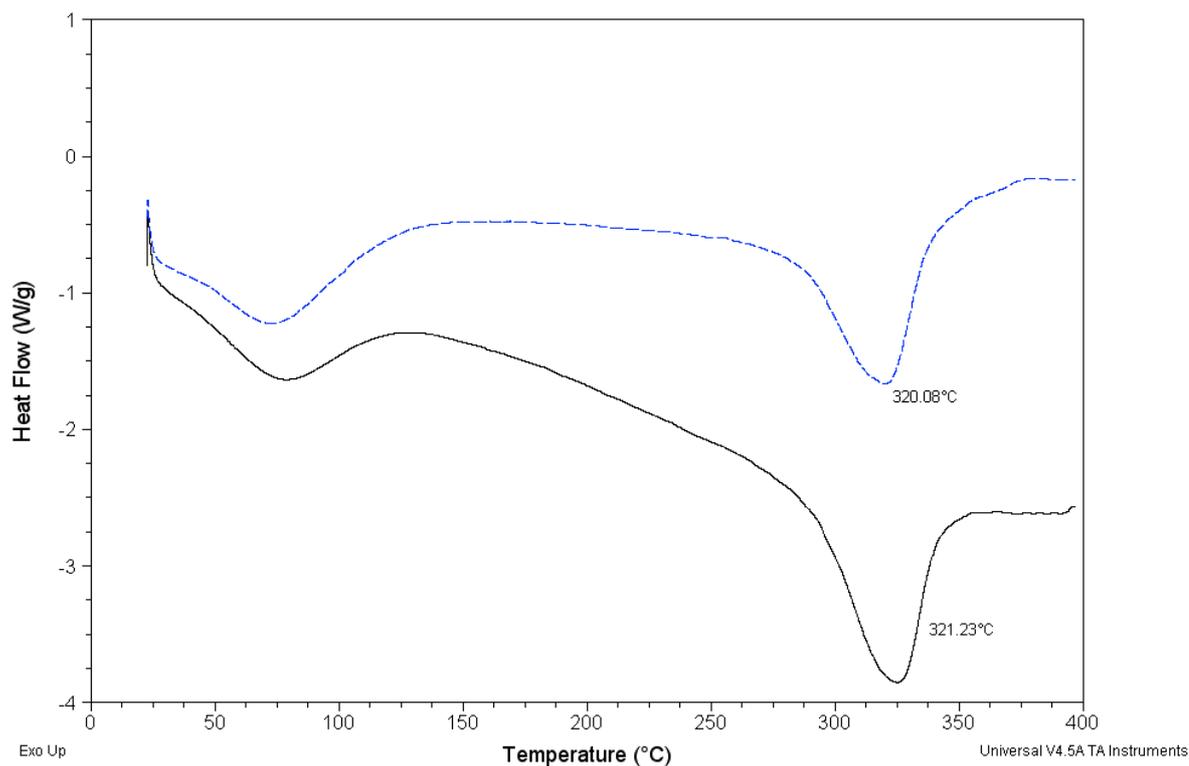


Fig. 22: Termogrammi ottenuti con l'analisi DSC del SilkTNT® prima (nero) e dopo (blu) sterilizzazione con vapore saturo sotto pressione.

Per quanto riguarda la sterilizzazione con raggi  $\gamma$  alle dosi di 20, 40 e 60 kGy, i campioni di SilkTNT® hanno dimostrato di sopportare bene la sterilizzazione a tutte le dosi di radiazione e di essere sterili dopo il processo, come risultato dal test eseguito con il sistema BacT/ALERT.

L'analisi FT-IR conferma che il processo di sterilizzazione, a tutte le dosi di radiazione valutate, non causa fenomeni degradativi nella fibroina che compone il SilkTNT®. Le Figg. 23 e 24 mostrano gli spettri FT-IR del SilkTNT® ottenuti prima e dopo irraggiamento  $\gamma$  ad una dose di 60 kGy: non sono osservabili importanti modificazioni dei profili e la posizione del picco di assorbimento relativo all'ammide I nella regione intorno a  $1620\text{ cm}^{-1}$  dimostra come la fibroina mantenga la struttura *silk II* anche in seguito all'irraggiamento.

Anche dall'analisi degli spettri FT-IR del SilkTNT® dopo irraggiamento  $\gamma$  alle dosi inferiori di 40 e 20 kGy non si evincono importanti differenze rispetto ai tracciati ottenuti prima del processo di irraggiamento.

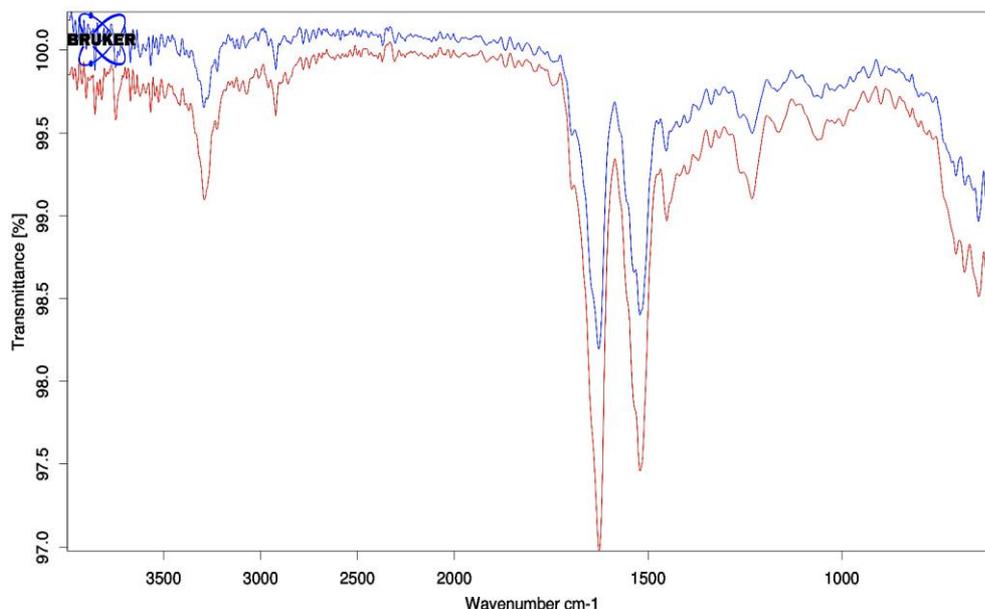


Fig. 23: Spettri FT-IR del SilkTNT® prima (rosso) e dopo (blu) sterilizzazione con raggi  $\gamma$  alla dose di 60 kGy.

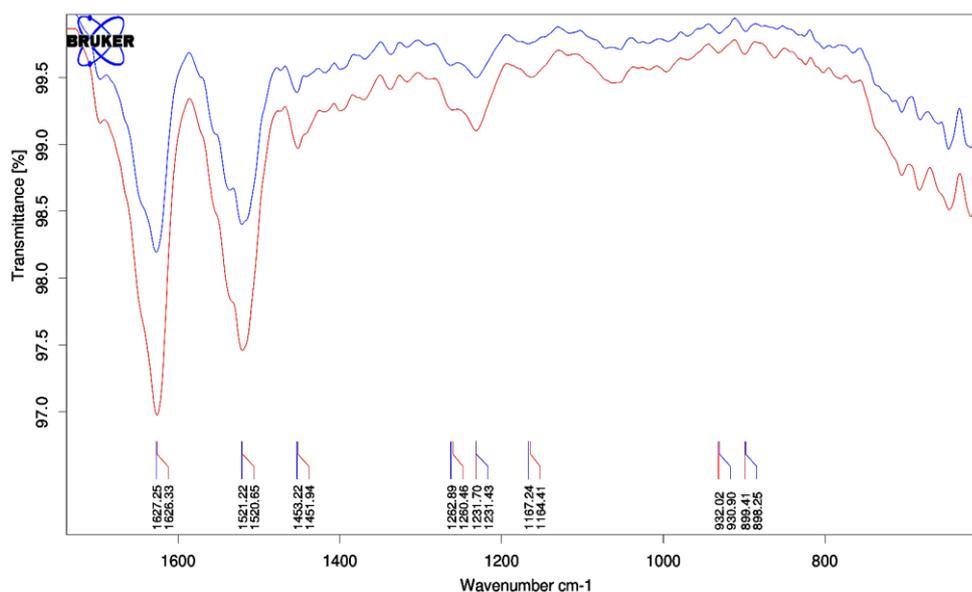


Fig. 24: Particolare spettri FT-IR del SilkTNT® prima (rosso) e dopo (blu) sterilizzazione con raggi  $\gamma$  alla dose di 60 kGy.

I risultati relativi all'analisi DSC del SilkTNT® prima e dopo sterilizzazione con raggi  $\gamma$  alla dose di 60 kGy sono riportati in Fig. 25: anche in questo caso è dimostrato come il processo di irraggiamento non influisca in alcun modo sulla struttura della fibroina. Risultati simili sono stati ottenuti con entrambe le dosi inferiori di radiazione.

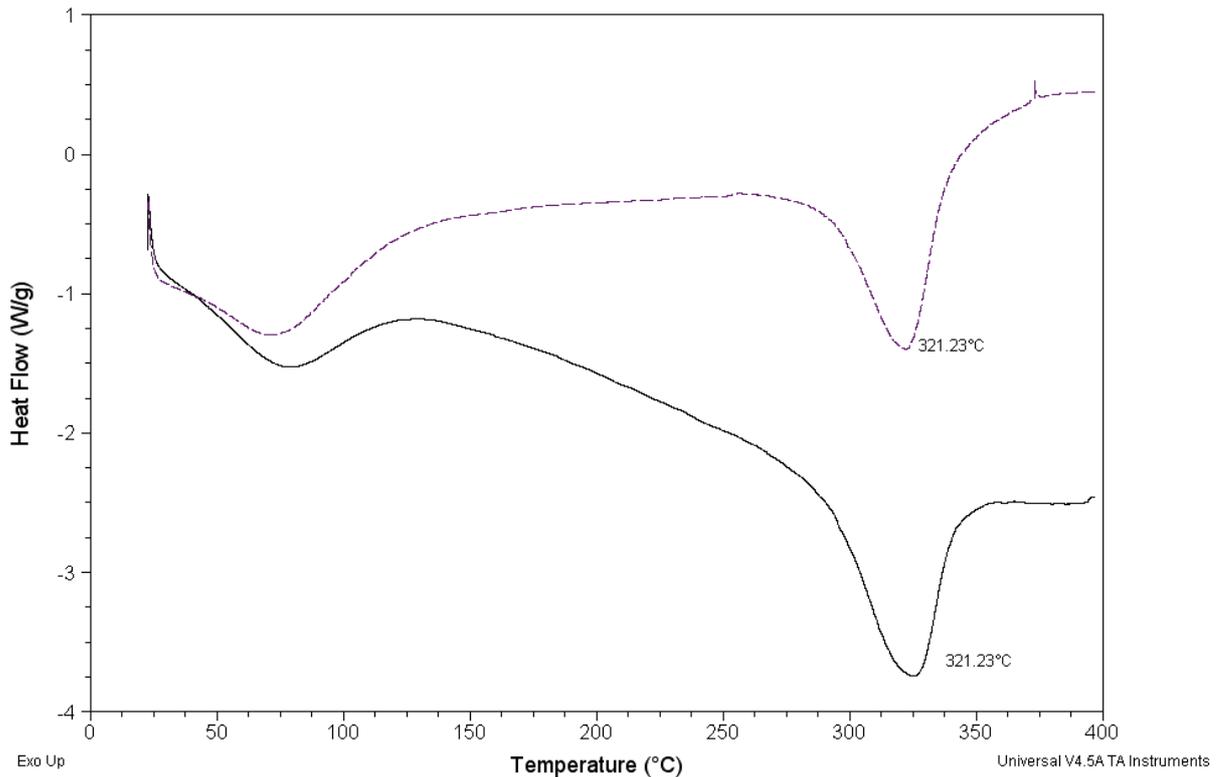


Fig. 25: Termogrammi ottenuti con l'analisi DSC del SilkTNT® prima (nero) e dopo (viola) sterilizzazione con raggi  $\gamma$  alla dose di 60 kGy.

I dati ottenuti con spettroscopia IR e DSC dopo irraggiamento  $\gamma$  sono particolarmente rilevanti poiché tale metodo di sterilizzazione è più facilmente applicabile ad una produzione di scaffold su larga scala.

Allo scopo di valutarne il potenziale impiego in ingegneria tissutale, il SilkTNT® sterilizzato in autoclave è stato impiegato come scaffold per la realizzazione di colture di cellule staminali mesenchimali umane derivate da tessuto adiposo (ADSC).

Le colture, dopo 15 giorni, sono state sottoposte ad indagini mediante microscopia elettronica a scansione (SEM) che ha permesso di valutare la crescita cellulare e la morfologia e l'integrità strutturale del non tessuto. La Fig. 26 mostra come le ADSC seminate sul SilkTNT® aderiscano bene alle fibre di fibroina e come, agevolate dalla struttura tridimensionale del non tessuto, siano cresciute al suo interno e si siano sviluppate nelle tre dimensioni dello spazio; le fibre, inoltre, dimostrano di mantenere la morfologia e l'integrità strutturale originaria anche in seguito a coltura.

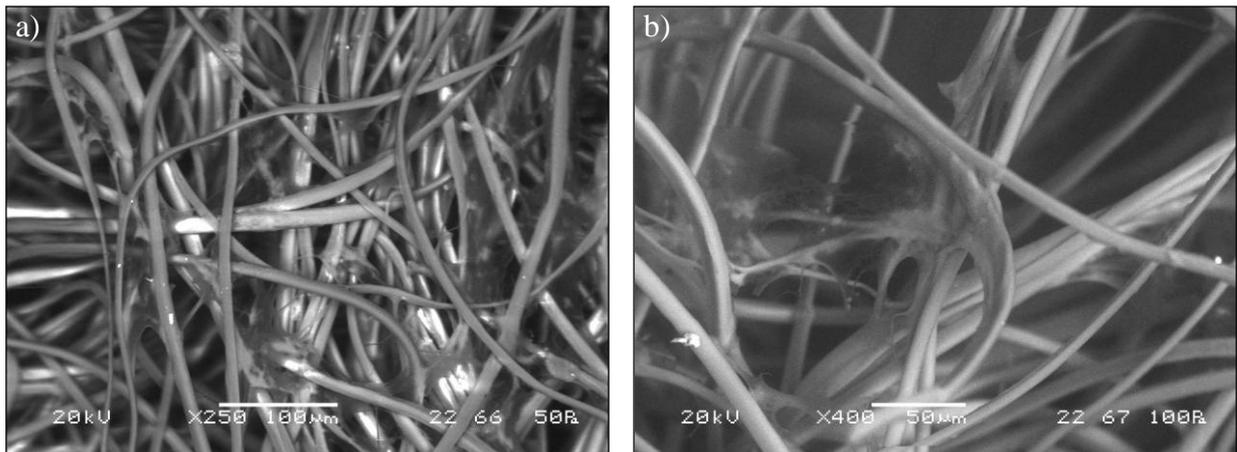
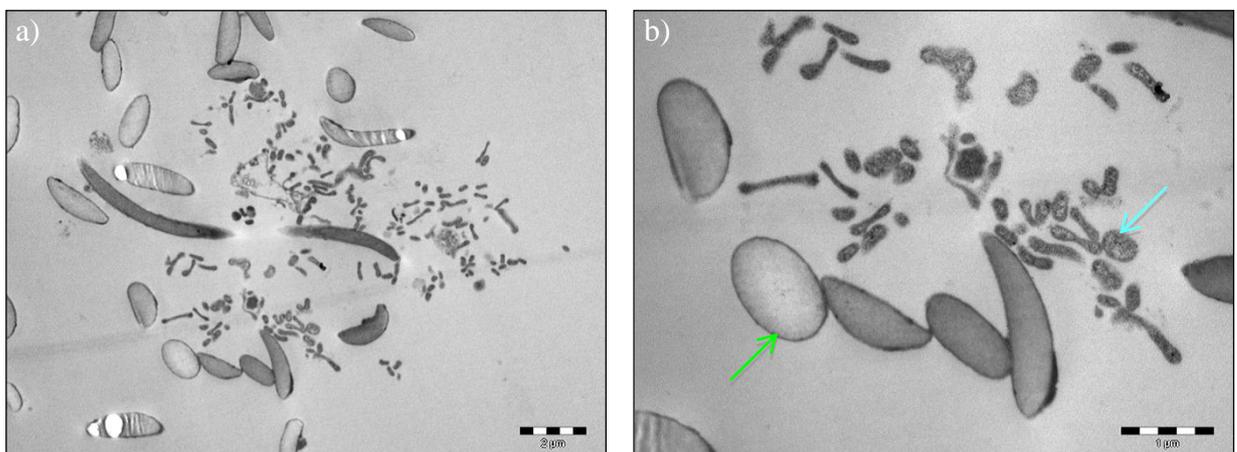


Fig. 26: Immagini al microscopio elettronico a scansione (SEM) del SilkTNT® dopo coltura di ADSC. a) ingrandimento 250X; b) ingrandimento 400X.

Una volta verificata la compatibilità del SilkTNT® con l'adesione e la crescita cellulare, è stato effettuato un esame al microscopio elettronico a trasmissione (TEM) per l'indagine della struttura interna delle cellule, che consente di verificare lo stato della vitalità cellulare.

In Fig. 27 a)-h) sono mostrate le fotografie effettuate al TEM di sezioni, ad ingrandimento sempre maggiore, delle ADSC adese alle fibre di fibroina che compongono il non tessuto: in Fig. 27 a)-c) sono visibili le sezioni delle propaggini cellulari (pseudopodi), attraverso le quali le cellule si ancorano a fibre diverse e diffondono nello spazio tra esse, e le sezioni delle fibre di fibroina, che possiedono dimensioni maggiori; in Fig. 27 d)-e) è possibile osservare, invece, a vari ingrandimenti, la sezione del corpo cellulare di una cellula saldamente adesa ad una fibra di fibroina in cui si distinguono mitocondri, reticolo endoplasmatico rugoso, strutture vacuolari e filamenti delle proteine di adesione. Il risultato dell'analisi ultrastrutturale suggerisce, quindi, una buona vitalità cellulare.



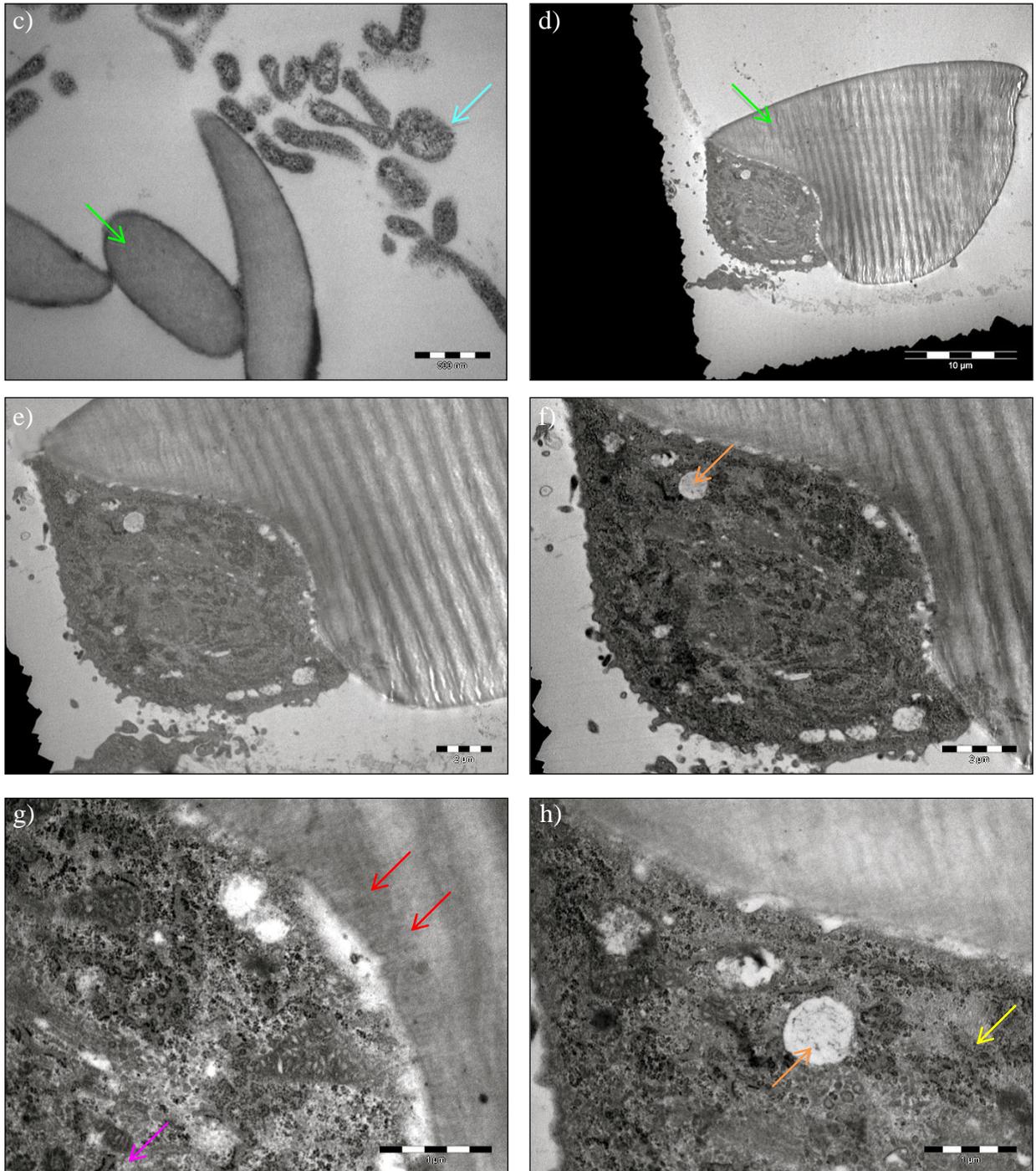


Fig. 27 a)-h): Fotografie al microscopio elettronico a trasmissione (TEM) delle ADSC adese alle fibre del SilkTNT®. In b) e c) le frecce indicano le sezioni di pseudopodi (→) e fibre di fibroina (→); in f), g) e h) le frecce indicano strutture vacuolari (→), reticolo endoplasmatico rugoso (→), mitocondri (→) e filamenti delle proteine di adesione (→).

Il SilkTNT® dimostra, quindi, di supportare molto bene l'adesione, la crescita e la vitalità delle ADSC e, inoltre, di mantenere l'integrità strutturale dopo la coltura cellulare.

Successivamente alla coltura di ADSC, il SilkTNT® sterilizzato in autoclave è stato valutato anche quale scaffold per la coltura di insule pancreatiche. Il SilkTNT®, infatti, grazie alla sua struttura tridimensionale, alla sua capacità di sopportare la sterilizzazione senza subire degradazione, alla sua produzione su scala industriale e alla sua capacità di sostenere l'adesione e la crescita cellulare, si presenta come un candidato ideale per l'utilizzo come scaffold impiantabile per l'adesione, il sostegno e il mantenimento della vitalità delle insule pancreatiche trapiantate.

Insule pancreatiche isolate da pancreas di donatori deceduti sono state mantenute in coltura con terreno 199 per non più di tre giorni (Fig. 28) e in seguito seminate su SilkTNT®.

Dopo un giorno le colture di insule su SilkTNT® sono state analizzate con microscopia ottica per verificare lo stato dell'adesione alle fibre di fibroina che compongono il non tessuto. Come si può osservare in Fig. 29 le insule trovano nelle fibre di fibroina un supporto ottimale e si ancorano a loro saldamente.

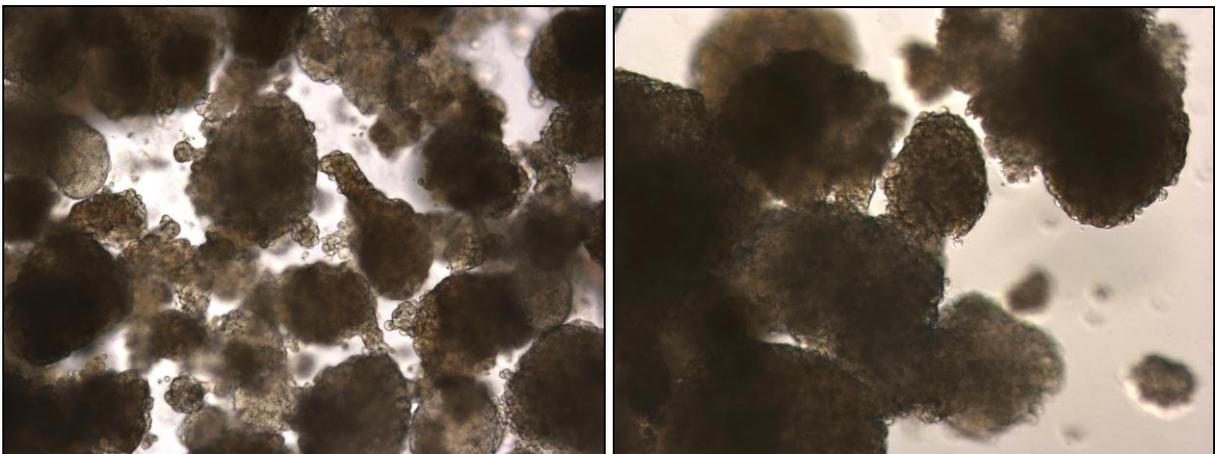


Fig. 28: Fotografie al microscopio ottico delle insule pancreatiche al terzo giorno di coltura, prima di essere seminate sul SilkTNT®.

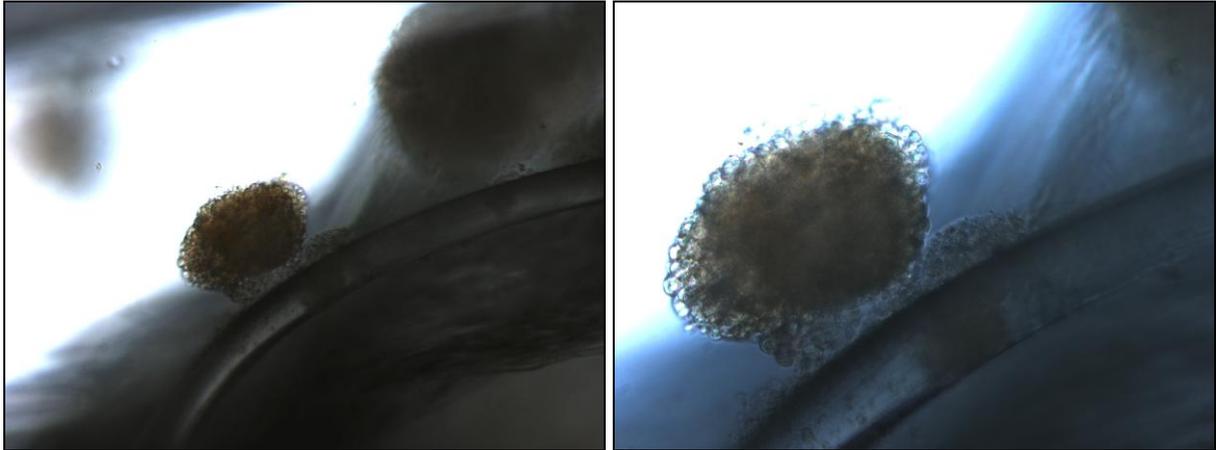


Fig. 29: Fotografie al microscopio ottico delle insule pancreatiche seminate sul SilkTNT® ed adese alle fibre di fibroina. a) ingrandimento 10X; b) ingrandimento 20X.

Le prospettive future di questo studio consistono nell'effettuare colorazioni delle insule con ematossilina-eosina, analisi immunoistochimiche delle stesse con anticorpi specifici per insulina e glucagone al fine di identificare la presenza, rispettivamente, di cellule  $\beta$  e cellule  $\alpha$ , e analisi con microscopia a fluorescenza e microscopia elettronica a scansione per verificare la vitalità e la morfologia delle cellule insulari. Inoltre, dovranno essere verificati gli effetti dei farmaci immunosoppressori sulle fibre di fibroina.

Lo scaffold potrebbe ospitare, inoltre, non solo le insule, ma anche altre cellule benefiche in co-cultura o agenti anti-infiammatori: le ADSC, facilmente reperibili tramite la semplice procedura chirurgica della liposuzione e risultate adese e vitali dopo coltura su SilkTNT®, potrebbero rappresentare un potenziale *feeder layer* che faciliti l'adesione delle insule allo scaffold, sostenga la loro vitalità e moduli la risposta infiammatoria post-impianto.

## CONCLUSIONI

La fibroina, principale proteina ricavata dalla seta, grazie alla sua biocompatibilità, biodegradabilità e permeabilità all'ossigeno ed al vapore acqueo rappresenta un biomateriale di elevato interesse nel campo dell'ingegneria tissutale.

Un tessuto non tessuto a base di fibre native di fibroina della seta (SilkTNT®), prodotto con la tecnologia *spunlace*, è stato caratterizzato e impiegato per l'allestimento di colture di cellule staminali da tessuto adiposo e di insule pancreatiche da donatore cadavere.

Le analisi effettuate mediante microscopia ottica ed elettronica a scansione hanno permesso di constatare la purezza delle fibre di fibroina che compongono il SilkTNT® che risultano totalmente prive di sericina e prive di tracce di metalli pesanti, possibilmente derivabili dal processo industriale di produzione.

Le analisi con spettroscopia FT-IR e calorimetria differenziale a scansione (DSC) prima della sterilizzazione e dell'allestimento delle colture cellulari hanno confermato come il processo di produzione con tecnologia *spunlace* non influisca in alcun modo sulla struttura secondaria della fibroina che compone il SilkTNT®, confermando il mantenimento della conformazione *silk II*, caratteristica della fibroina nativa e responsabile delle eccezionali proprietà meccaniche di tale fibra.

Mediante una prova di resistenza a trazione e di allungamento il SilkTNT® con peso/unità di superficie di 152 g/m<sup>2</sup> ed orientamento “macchina” ha dimostrato di possedere la potenzialità per il disegno di protesi nell'ingegneria dei legamenti.

Le analisi FT-IR e DSC del SilkTNT® successive a sterilizzazione mediante vapore saturo sotto pressione e raggi  $\gamma$  hanno dimostrato che in entrambi i casi la fibroina del non tessuto non subisce alcuna degradazione e mantiene la caratteristica conformazione *silk II*.

Il SilkTNT® sterilizzato con vapore saturo sotto pressione è stato scelto per l'allestimento delle colture cellulari: tramite analisi con microscopia elettronica a scansione e a trasmissione si è dimostrato che il tessuto non tessuto è in grado di supportare efficacemente l'adesione, la crescita e la proliferazione di ADSC; tramite analisi con microscopia ottica, invece, si è dimostrato che il tessuto non tessuto è in

grado di sostenere l'adesione di insule pancreatiche isolate da donatore cadavere. In conclusione, il SilkTNT® ha dimostrato di possedere ottimali proprietà per un possibile impiego nel campo dell'ingegneria tissutale ed, in particolare, quale scaffold in pura fibroina, prodotto su larga scala e a costi contenuti, per l'adesione e il trapianto di insule pancreatiche in pazienti affetti da diabete mellito di tipo I.

Co-colture di ADSC e insule pancreatiche su SilkTNT® potranno rivelarsi utili per facilitare l'adesione delle insule allo scaffold, sostenerne la vitalità, ridurre il rischio di rigetto post-impianto e ridurre le dosi di farmaci immunosoppressori.

## BIBLIOGRAFIA

- Acharya C, Dutta A, Kundu SC.** Surface treatment of pure and PEG-4000 blended fibroin films and their characterizations as matrices for in vitro fibroblast culture. *Journal of Biomaterial Applications* 2009, 23: 497-517.
- Alsalameh S, Amin R, Gemba T, Lotz M.** Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 1522-1532.
- Altman GH, Diaz F, Jakuba C, Calabro T, Horan RL, Chen J, Lu H, Richmond J, Kaplan DL.** Silk-based biomaterials. *Biomaterials* 2003; 24: 401-416.
- Altman GH, Horan RL, Lu HH, Moreau J, Martin I, Richmond JC, Kaplan DL** (a). Silk matrix for tissue engineered anterior cruciate ligaments. *Biomaterials* 2002; 23: 4131-4141.
- Altman GH, Horan RL, Martin I, Farhadi J, Stark PR, Volloch V, Richmond JC, Vunjak-Novakovic G, Kaplan DL** (b). Cell differentiation by mechanical stress. *Faseb J* 2002; 16: 270-272.
- Altman GH, Lu HH, Horan RL, Calabro T, Ryder D, Kaplan DL, Stark P, Martin I, Richmond JC, Vunjak-Novakovic G** (c). Advanced bioreactor with controlled application of multi-dimensional strain for tissue engineering. *J Biomech Eng* 2002; 124: 742-749.
- Aoki H, Tomita N, Morita Y, Hattori K, Harada Y, Sonobe M, Wakitani S, Tamada Y.** Culture of chondrocytes in fibroin-hydrogel sponge. *Biomed Mater Eng* 2003; 13: 309-316.
- Arai T, Freddi G, Innocenti R, Tsukada M.** Biodegradation of Bombyx mori silk fibroin fibers and films. *Journal of Applied Polymer Science* 2004; 91: 2383-2390.
- Arai T, Wilson DL, Kasai N, Freddi G, Hayasaka S, Tsukada M.** Preparation of silk fibroin and polyallylamine composites. *J Appl Polym Sci* 2002; 84: 1963-1970.
- Aramwit P, Kanokpanont S, De-Eknamkul W, Srichana T.** Monitoring of inflammatory mediators induced by silk sericin. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2009; 107: 556-561.
- Astori G, Vignali F, Bardelli S, Tubio M, Gola M, Albertini V, Bambi F.** "In vitro" and multicolor phenotypic characterization of cell subpopulations identified in fresh human adipose tissue stromal vascular fraction and in the derived mesenchymal stem cells. *Journal of Translation Medicine* 2007; 5: 55.

- Ayutsede J, Gandhi M, Sukigara S, Micklus M, Chen HE, Ko F.** Regeneration of Bombyx mori silk by electrospinning - Part 3: characterization of electrospun nonwoven mat. *Polymer* 2005; 46: 1625-1634.
- Barry FP, Murphy JM.** Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36: 568-584.
- Bircoll M.** Cosmetic breast augmentation utilizing autologous fat and liposuction techniques. *Plastic Reconstructive Surgery* 1987; 79: 267-271.
- Bobis S, Jarocho D, Majka M.** Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochem Cytobiol* 2006; 44: 215-230.
- Buchwald P, Bocca N, Marzorati S, Hochhaus G, Bodor N, Stabler C, Kenyon NS, Inverardi L, Molano RD, Ricordi C, Pileggi A.** Feasibility of localized immunosuppression: 1. Exploratory studies with glucocorticoids in a biohybrid device designed for cell transplantation. *Pharmazie* 2010; 65: 421-428.
- Cai K, Yao K, Lin S, Yang Z, Li X, Xie H, Qing T, Gao L.** Poly(D,L-lactic acid) surfaces modified by silk fibroin: effects on the culture of osteoblast in vitro. *Biomaterials* 2002; 23: 1153-1160.
- Cancedda R, Dozin B, Giannoni P, Quarto R.** Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone. *Matrix Biol* 2003; 22: 81-91.
- Cao Y, Wang B.** Biodegradation of silk biomaterials. *International Journal of Molecular Science* 2009; 10: 1514-1524.
- Chen J, Altman GH, Karageorgiou V, Horan R, Collette A, Volloch V, Colabro T, Kaplan DL.** Human bone marrow stromal cell and ligament fibroblast responses on RGD-modified silk fibers. *J Biomed Mater Res A* 2003; 67: 559-570.
- Chen X, Li WJ, Yu TY (a).** Conformation transition of silk fibroin induced by blending chitosan. *J Polym Sci Part B - Polym Phys* 1997; 35: 2293-2296.
- Chen X, Li WJ, Zhong W, Lu YH, Yu TY (b).** pH sensitivity and ion sensitivity of hydrogels based on complex-forming chitosan/silk fibroin interpenetrating polymer network. *J Appl Polym Sci* 1997; 65: 2257-2262.
- Chen X, Shao Z, Marinkovic NS, Miller LM, Zhou P, Chance MR.** Conformation transition kinetics of regenerated Bombyx mori silk fibroin membrane monitored by time-resolved FTIR spectroscopy. *Biophysical Chemistry* 2001; 89: 25-34.
- Chiarini A, Petrini P, Bozzini S, Pra ID, Armato U.** Silk fibroin/poly(carbonate)-urethane as a substrate for cell growth: in vitro interactions with human cells. *Biomaterials* 2003; 24: 789-799.

- Coleman SR.** Long-term survival of fat transplants: controlled demonstrations. *Journal of Aesthetic Plastic Surgery* 1995; 19: 421-425.
- Dal Pra I, Freddi G, Minic J, Chiarini A, Armato U.** De novo engineering of reticular connective tissue in vivo by silk fibroin nonwoven materials. *Biomaterials* 2005; 26: 1987-1999.
- Dal Pra I, Petrini P, Charini A, Bozzini S, Fare S, Armato U.** Silk fibroin-coated three-dimensional polyurethane scaffolds for tissue engineering: interactions with normal human fibroblasts. *Tissue Eng* 2003; 9: 1113-1121.
- De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP.** Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 1928-1942.
- Delany J, Floyd ZE, Zvonic S, Smith A, Gravois A, Reiners E, Wu X, Kilroy G, Lefevre M, Gimble JM.** Proteomic analysis of primary cultures of human adipose derived stem cells: modulation by adipogenesis. *Molecular & Cellular Proteomics* 2005; 4: 731-740.
- Dennis JE, Merriam A, Awadallah A, Yoo JU, Johnstone B, Caplan AI.** A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse. *Journal of Bone and Mineral Research* 1999; 14: 700-709.
- Dutta RC, Dutta AK.** Cell-interactive 3D-scaffold; advances and applications. *Biotechnology Advances* 2009; 27: 334-339.
- EDANA** - The international association serving the nonwovens and related industries. Web site: [www.edana.org](http://www.edana.org); ultimo accesso 22 Novembre 2010.
- Faustini M, Bucco M, Chlapanidas T, Lucconi G, Marazzi M, Tosca MC, Gaetani P, Klinger M, Villani S, Ferretti VV, Vigo D, Torre ML.** Nonexpanded Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Medicine: Yield in Stromal Vascular Fraction from Adipose Tissues. *Tissue Engineering: Part C* 2010.
- Fini M, Motta A, Torricelli P, Giavaresi G, Nicoli Aldini N, Tschon M, Giardino R, Migliaresi C.** The healing of confined critical size cancellous defects in the presence of silk fibroin hydrogel. *Biomaterials* 2005; 26: 3527-3536.
- Freddi G** (2008). Membrane di fibroina (*Bombyx mori*): preparazione, caratterizzazione e applicazioni.
- Freddi G, Romanò M, Massafra MR, Tsukada M.** Silk fibroin/cellulose blend films: Preparation, structure, and physical properties. *J Appl Polym Science* 1995; 56: 1537-1545.

- Freddi G, Tsukada M, Beretta S.** Structure and physical properties of silk fibroin polyacrylamide blend films. *J Appl Polym Sci* 1999; 71: 1563-1571.
- Fukumoto T, Sperling JW, Sanyal A, Fitzsimmons JS, Reinholz GG, Conover CA, O'Driscoll SW.** Combined effects of insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta1 on periosteal mesenchymal cells during chondrogenesis in vitro. *Osteoarthritis Cartilage* 2003; 11: 55-64.
- Fulton JE, Suarez M, Silverton K, Barnes T.** Small volume fat transfer. *Dermatologic Surgery* 1998; 24: 857-865.
- Garcia-Fuentes M, Giger E, Meinel L, Merkle HP.** The effect of hyaluronic acid on silk fibroin conformation. *Biomaterials* 2008; 29: 633-642.
- Gellynck K.** Silk and spider silk in tissue engineering. Ghent University 2006; ISBN 90-8578-054-3.
- Goldberg M, Langer R, Jia X.** Nanostructured materials for applications in drug delivery and tissue engineering. *J Biomater Sci Polymer* 2007; 18: 241-268.
- Gombotz WR, Guanghui W, Horbett TA, Hoffman AS.** Protein adsorption to poly(ethylene oxide) surfaces. *J Biomed Mater Res* 1991; 25: 1547-1562.
- Gotoh Y, Tsukada M, Minoura N.** Effect of the chemical modification of the arginyl residue in Bombyx mori silk fibroin on the attachment and growth of fibroblast cells. *J Biomed Mater Res* 1998; 39: 351-357.
- Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, Robey PG, Storms RW, Gimple JM.** Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *Journal of Cellular Physiology* 2001; 189: 54-63.
- Haider M, Megeed Z, Ghandehari H.** Genetically engineered polymers: status and prospects for controlled release. *J Control Release* 2004; 95: 1-26.
- Harris LD, Kim BS, Mooney DJ.** Open pore biodegradable matrices formed with gas foaming. *J. Biomed. Mater. Res.* 1998; 42: 396-402.
- Hartgerink JD, Beniash E, Stupp SI.** Peptide-amphiphile nanofibers: a versatile scaffold for the preparation of self-assembling materials. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 5133-5138.
- Hofmann S, Hagenmüller H, Koch AM, Müller R, Vunjak-Novakovic G, Kaplan DL, Merkle HP, Meinel L.** Control of in vitro tissue-engineered bone-like structures using human mesenchymal stem cells and porous silk scaffolds. *Biomaterials* 2007; 28: 1152-1162.

- Horan RL, Antle K, Collette AL, Wang Y, Huang J, Moreau JE, Volloch V, Kaplan DL, Altman GH.** In vitro degradation of silk fibroin. *Biomaterials* 2005; 26: 3385-3393.
- Horan RL, Collette AL, Lee C, Antle K, Chen J, Altman GH.** Yarn design for functional tissue engineering. *J Biomech* 2006; 39: 2232-2240.
- Hou QP, Grijpma DW, Feijen J.** Porous polymeric structures for tissue engineering prepared by a coagulation, compression moulding and salt leaching technique. *Biomaterials* 2003; 24: 1937-1947.
- Housman TS, Lawrence N, Mellen BG, George MN, Filippo JS, Cerveny KA, DeMarco M, Feldman SR, Fleischer AB.** The safety of liposuction: results of a national survey. *Dermatologic Surgery* 2002; 28: 971-978.
- Hu K, Lv Q, Cui FZ, Feng QL, Kong XD, Wang HL, Huang LY, Li T.** Biocompatible fibroin blended films with recombinant human-like collagen for hepatic tissue engineering. *J Bioact Compat Polym* 2006; 21: 23-37.
- Hu X, Kaplan DL, Cebe P.** Determining  $\beta$ -sheet crystallinity in fibrous proteins by thermal analysis and infrared spectroscopy. *Macromolecules* 2006; 39: 6161-6170.
- in't Anker PS, Noort WA, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, Kruisselbrink AB, van Bezooijen RL, Beekhuizen W, Willemze R, Kanhai HH, Fibbe WE.** Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. *Haematologica* 2003; 88: 845-852.
- Inouye K, Kurokawa M, Nishikawa S, Tsukada M.** Use of Bombyx mori silk fibroin as a substratum for cultivation of animal cells. *J Biochem Biophys Methods* 1998; 37: 159-164.
- Ishizuya T, Yokose S, Hori M, Noda T, Suda T, Yoshiki S, Yamaguchi A.** Parathyroid hormone exerts disparate effects on osteoblast differentiation depending on exposure time in rat osteoblastic cells. *J Clin Invest* 1997; 99: 2961-2970.
- Jabbarzadeh E, Jiang T, Deng M, Nair LS, Khan YM, Laurencin CT.** Human endothelial cell growth and phenotypic expression on three dimensional poly(lactide-co-glycolide) sintered microsphere scaffolds for bone tissue engineering. *Biotechnol Bioeng* 2007; 98: 1094-1102.
- Jankowski RJ, Deasy BM, Huard J.** Muscle-derived stem cells. *Gene Ther* 2002; 9: 642-647.
- Jin HJ, Chen J, Karageorgiou V, Altman GH, Kaplan DL (b).** Human bone marrow stromal cell responses on electrospun silk fibroin mats. *Biomaterials* 2004; 25: 1039-1047.

- Jin HJ, Park J, Valluzzi R, Cebe P, Kaplan DL (a).** Biomaterial films of Bombyx mori silk fibroin with poly(ethylene oxide). *Biomacromolecules* 2004; 5: 711-717.
- Karageorgiou V, Meinel L, Hofmann S, Malhotra A, Volloch V, Kaplan D.** Bone morphogenetic protein-2 decorated silk fibroin films induce osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells. *J Biomed Mater Res A* 2004; 71: 528-537.
- Kardestuncer T, McCarthy MB, Karageorgiou V, Kaplan D, Gronowicz G.** RGD-tethered silk substrate stimulates the differentiation of human tendon cells. *Clin Orthop Relat Res* 2006; 448: 234-239.
- Kesenci K, Motta A, Fambri L, Migliaresi C.** Poly(epsilon-caprolactone-co-D,L-lactide)/silk fibroin composite materials: preparation and characterization. *J Biomater Sci Polym Ed* 2001; 12: 337-351.
- Kim HJ, Kim UJ, Vunjak-Novakovic G, Min BH, Kaplan DL.** Influence of macroporous protein scaffolds on bone tissue engineering from bone marrow stem cells. *Biomaterials* 2005; 26: 4442-4452.
- Kim KH, Jeong L, Park HN, Shin SY, Park WH, Lee SC, Kim TI, Park YJ, Seol YJ, Lee YM, Ku Y, Rhyu IC, Han SB, Chung CP.** Biological efficacy of silk fibroin nanofiber membranes for guided bone regeneration. *J Biotechnol* 2005; 120: 327-339.
- Kim UJ, Park J, Kim HJ, Wada M, Kaplan DL.** Three-dimensional aqueous-derived biomaterial scaffolds from silk fibroin. *Biomaterials* 2005; 26: 2775-2785.
- Kim UJ, Park J, Li C, Jin HJ, Valluzzi R, Kaplan DL.** Structure and properties of silk hydrogels. *Biomacromolecules* 2004; 5: 786-792.
- Kim WS, Park BS, Sung JH, Yang JM, Park SB, Kwak SJ, Park JS.** Wound healing effect of adipose-derived stem cells: A critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts. *Journal of Dermatological Science* 2007; 48: 15-24.
- Klinger M, Marazzi M, Vigo D, Torre M.** Fat injection for cases of severe burn outcomes: a new perspective of scar remodeling and reduction. *Aesthetic Plastic Surgery* 2008; 32: 465-469.
- Kurioka A, Yamazaki M, Hirano H.** Primary structure and possible functions of a trypsin inhibitor of Bombyx mori. *European Journal of Biochemistry* 1999; 259: 120-126.
- Kweon HY, Park SH, Ye JH, Lee YW, Cho CS.** Preparation of semi-interpenetrating polymer networks composed of silk fibroin and poly(ethylene glycol) macromer. *J Appl Polym Sci* 2001; 80: 1848-1853.

- Langer R, Tirrell D.** Designing materials for biology and medicine. *Nature* 2004; 428: 487-492.
- Langer R, Vacanti JP.** Tissue engineering. *Science* 1993; 260: 920-926.
- Laurencin CT, Freeman JW.** Ligament tissue engineering: an evolutionary materials science approach. *Biomaterials* 2005; 26: 7530-7536.
- Lawrence BD, Omenetto F, Chui K, Kaplan DL.** Processing methods to control silk fibroin film biomaterial features. *Journal of materials science* 2008; 43: 6967-6985.
- Lawrence BD, Omenetto F, Chui K, Kaplan DL.** Processing methods to control silk fibroin film biomaterial features. *Journal of materials science* 2008, 43: 6967-6985.
- Leal-Egaña A, Scheibel T.** Silk-based materials for biomedical applications. *Biotechnol Appl Biochem* 2010; 55: 155-167.
- Lee KY, Ha WS.** DSC studies on bound water in silk fibroin/S-carboxymethyl kerateine blend films. *Polymer* 1999; 40: 4131-4134.
- Lee KY, Kong SJ, Park WH, Ha WS, Kwon IC.** Effect of surface properties on the antithrombogenicity of silk fibroin/S-carboxymethyl kerateine blend films. *J Biomater Sci Polym Ed* 1998; 9: 905-914.
- Lee SH, Kim BS, Kim SH, Choi SW, Jeong SI, Kwon IK, Kang SW, Nikolovski J, Mooney DJ, Han YK, Kim YH.** Elastic biodegradable poly(glycolide-co-caprolactone) scaffold for tissue engineering. *J Biomed Mat Res A* 2003; 66: 29-37.
- Li D, Wang YL, Xia YN.** Electrospinning nanofibers as uniaxially aligned arrays and layer-by-layer stacked films. *Adv. Mater.* 2004; 16: 361-366.
- Li M, Ogiso M, Minoura N.** Enzymatic degradation behaviour of porous silk fibroin sheets. *Biomaterials* 2003; 24: 357-365.
- Liapis AI, Pikal MJ, Bruttini R.** Research and development needs and opportunities in freeze drying. *Dry. Technol.* 1996; 14: 1265-1300.
- Liua X, Wona Y, Ma PX.** Porogen-induced surface modification of nano-porous poly(L-lactic acid) scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* 2006; 27: 3980-3987.
- Isberg E, Anderson KW, Albeiruti A, Franceschi RT, Mooneyl DJ.** Cell-interactive alginate hydrogels for bone tissue engineering. *J Dent Res* 2001; 80: 2025-2029.
- Lucas F, Shaw JTB, Smith SG.** The silk fibroin. *Advanced Protein Chemistry* 1958; 13: 107-242.

- Lucas PA, Calcutt AF, Ossi P, Young HE, Southerland SS.** Mesenchymal stem cell from granulation tissue. *Journal of Cell Biochemistry* 1993; 17E:122.
- MacArthur BD, Oreffo RO.** Bridging the gap. *Nature* 2005; 433: 19.
- MacIntosh AC, Kearns VR, Crawford A, Hatton PV.** Skeletal tissue engineering using silk biomaterials. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 2008; 2: 71-80.
- Magoshi J, Nakamura S.** Studies on physical properties and structure of silk. Glass transition and crystallization of silk fibroin. *Journal of Applied Polymer Science* 1975; 19: 1013-1015.
- Marzorati S, Bocca N, Molano RD, Hogan AR, Doni M, Cobiauchi L, Inverardi L, Ricordi C, Pileggi A.** Effects of systemic immunosuppression on islet engraftment and function into a subcutaneous biocompatible device. *Transplant Proc* 2009; 41: 352-353.
- Mathieu LM, Mueller TL, Bourban PE, Pioletti DP, Müller R, Månson JA.** Architecture and properties of anisotropic polymer composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2006; 27: 905-916.
- Mathur AB, Tonelli A, Rathke T, Hudson S.** The dissolution and characterization of Bombyx mori silk fibroin in calcium nitrate-methanol solution and the regeneration of films. *Biopolymers* 1997; 42: 61-74.
- Megeed Z, Cappello J, Ghandehari H.** Controlled release of plasmid DNA from a genetically engineered silk-elastinlike hydrogel. *Pharm Res* 2002; 19: 954-959.
- Meinel L, Fajardo R, Hofmann S, Langer R, Chen J, Snyder B, Vunjak-Novakovic G, Kaplan DL (b).** Silk implants for the healing of critical size bone defects. *Bone* 2005; 37: 688-698.
- Meinel L, Hofmann S, Karageorgiou V, Kirker-Head C, McCool J, Gronowicz G, Zichner L, Langer R, Vunjak-Novakovic G, Kaplan DL (a).** The inflammatory responses to silk films in vitro and in vivo. *Biomaterials* 2005; 26: 147-155.
- Meinel L, Hofmann S, Karageorgiou V, Zichner L, Langer R, Kaplan DL, Vunjak-Novakovic G.** Engineering cartilage-like tissue using human mesenchymal stem cells and silk protein scaffolds. *Biotechnol Bioeng* 2004; 88: 379-391.
- Min BM, Lee G, Kim SH, Nam YS, Lee TS, Park WH.** Electrospinning of silk fibroin nanofibers and its effect on the adhesion and spreading of normal human keratinocytes and fibroblasts in vitro. *Biomaterials* 2004; 25: 1289-1297.

- Minoura N, Tsukada M, Nagura M (a).** Physico-chemical properties of silk fibroin membrane as a biomaterial. *Biomaterials* 1990; 11: 430-434.
- Minoura N, Tsukada M, Nagura M (b).** Fine structure and oxygen permeability of silk fibroin membrane treated with methanol. *Polymer* 1990; 31: 265-269.
- Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, Garret S, Ployd ZE, Loster A, Di Halvorsen Y, Storms RW, Goh B, Kilroy G, Wu X, Gimble JM.** The immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated markers. *Stem Cell* 2006; 24: 376-385.
- Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S.** SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 5807-5812.
- Moore MJ, Jabbari E, Ritman EL, Lu L, Currier BL, Windebank AJ, Yaszemski MJ.** Quantitative analysis of interconnectivity of porous biodegradable scaffolds with micro-computed tomography. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 2004; 71: 258-267.
- Morita Y, Tomita N, Aoki H, Sonobe M, Wakitani S, Tamada Y, Suguro T, Ikeuchi K.** Frictional properties of regenerated cartilage in vitro. *J Biomech* 2006; 39: 103-109.
- Motta A, Migliaresi C, Faccioni F, Torricelli P, Fini M, Giardino R.** Fibroin hydrogels for biomedical applications: preparation, characterization and in vitro cell culture studies. *J Biomater Sci Polym Ed* 2004; 15: 851-864.
- Nathan S, Das De S, Thambyah A, Fen C, Goh J, Lee EH.** Cell-based therapy in the repair of osteochondral defects: a novel use for adipose tissue. *Tissue Eng* 2003; 9: 733-744.
- Nazarov R, Jin HJ, Kaplan DL.** Porous 3-D scaffolds from regenerated silk fibroin. *Biomacromolecules* 2004; 5: 718-726.
- Nguyen KT, West JL.** Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications. *Biomaterials* 2002; 23: 4307-4314.
- Noth U, Osyczka AM, Tuli R, Hickok NJ, Danielson KG, Tuan RS.** Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. *J Orthop Res* 2002; 20: 1060-1069.
- Park KH, Na K, Chung HM.** Enhancement of the adhesion of fibroblasts by peptide containing an arg-gly-asp sequence with poly(ethylene glycol) into a thermo-reversible hydrogel as a synthetic extracellular matrix. *Biotechnol Lett* 2005; 27: 227-231.

- Pate DW, Southerland SS, Grande DA, Young HE, Lucas PA.** Isolation and differentiation of mesenchymal stem cell from rabbit muscle. *Surgical Forum XLIV* 1993; 518.
- Peroni D, Scambi I, Pasini A, Lisi V, Bifari F, Krampera M, Rigotti G, Sbarbati A, Galiè M.** Stem molecular signature of adipose-derived stromal cells. *Experimental Cell Research* 2008; 314: 603-615.
- Petrini P, Parolari C, Tanzi MC.** Silk fibroin-polyurethane scaffolds for tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med* 2001; 12: 849-853.
- Pileggi A, Molano RD, Ricordi C, Zahr E, Collins J, Valdes R, Inverardi L.** Reversal of diabetes by pancreatic islet transplantation into a subcutaneous, neovascularized device. *Transplantation* 2006; 81: 1318-24.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR.** Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 143-147.
- Reneker DH, Chun I.** Nanometre diameter fibres of polymer, produced by electrospinning. *Nanotechnology* 1996; 7: 216-223.
- Rice WL, Firdous S, Gupta S, Hunter M, Foo CWP, Wang Y, Kim HJ, Kaplan DL, Georgakoudi I.** Non-invasive characterization of structure and morphology of silk fibroin biomaterials using non-linear microscopy. *Biomaterials* 2008; 29: 2015-2024.
- Ricordi C, Cobianchi L, Poggioli R, Pileggi A, Alessiani M, Dionigi P.** Transplantation of pancreatic islets: State of the art. *Leadership Medica* 2007; 2: 4-13.
- Ricordi C, Lacy PE, Finke EH, Olack BJ, Scharp DW.** Automated method for isolation of human pancreatic islets. *Diabetes* 1988; 37: 413-420.
- Rotter N, Aigner J, Naumann A, Planck H, Hammer C, Burmester G, Sittlinger M.** Cartilage reconstruction in head and neck surgery: comparison of resorbable polymer scaffolds for tissue engineering of human septal cartilage. *J Biomed Mater Res* 1998; 42: 347-356.
- Ruoslahti E, Pierschbacher MD.** New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* 1987; 238: 491-497.
- Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL, Davies JE.** In vivo response to starch-based scaffolds designed for bone tissue engineering applications. *J Biomed Mater Res A* 2006; 80: 983-989.

- Sannino A, Madaghiele M, Conversano F, Mele G, Maffezzoli A, Netti PA, Ambrosio L, Nicolais L.** Cellulose derivative-hyaluronic acid-based microporous hydrogels cross-linked through divinyl sulfone (DVS) to modulate equilibrium sorption capacity and network stability. *Biomacromolecules* 2004; 5: 92-96.
- Santin M, Motta A, Freddi G, Cannas M.** In vitro evaluation of the inflammatory potential of the silk fibroin. *Journal of Biomedical Materials Research* 1999; 46: 382-389.
- Sengenès C, Lolmède K, Zakaroff-Girard A, Busse R, Bouloumié A.** Preadipocytes in the human subcutaneous adipose tissue display distinct features from the adult mesenchymal and hematopoietic stem cells. *Journal of Cellular Physiology* 2005; 205: 114-122.
- Sensebé L, Krampera M, Schrezenmeier H, Bourin P, Giordano R.** Mesenchymal stem cells for clinical application. *Vox Sanguinis* 2010; 98: 93-107.
- Shiffman MA, Mirrafati S.** Fat transfer techniques: the effect of harvest and transfer methods of adipocyte viability and review of the literature. *Dermatologic Surgery* 2001; 27: 819-826.
- Sofia S, McCarthy MB, Gronowicz G, Kaplan DL.** Functionalized silk-based biomaterials for bone formation. *J Biomed Mater Res* 2001; 54: 139-148.
- Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, Fraser JK, Hedrick MH.** Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *The Keio Journal of Medicine* 2005; 54: 132-141.
- Stupp SI, LeBonheur V, Walker K, Li LS, Huggins KE, Keser M, Amstutz A.** Supramolecular Materials: Self-Organized Nanostructures. *Science* 1997; 276: 384-389.
- Sugihara A, Sugiura K, Morita H, Ninagawa T, Tubouchi K, Tobe R, Izumiya M, Horio T, Abraham NG, Ikehara S.** Promotive effects of a silk film on epidermal recovery from full-thickness skin wounds. *Proc Soc Exp Biol Med* 2000; 225: 58-64.
- Sugiyama H, Meda K, Yamato M, Hayashi R, Soma T, Hayashida Y, Yang J, Shirakabe M, Matsuyama A, Kikuchi A, Sawa Y, Okano T, Tano Y, Nishida K.** Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a novel feeder layer for epithelial cells. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 2008; 2: 445-449.
- Tsukada M, Freddi G, Crighton JS.** Structure and compatibility of poly(vinyl alcohol)-silk fibroin (PVA/SF) blend films. *J Polym Sci Part B - Polym Phys* 1994; 32: 243-248.

- Tuan RS, Boland G, Tuli R.** Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Res Ther* 2003; 5: 32-45.
- Um IC, Kweon HY, Park YH, Hudson S.** Structural characteristics and properties of the regenerated silk fibroin prepared from formic acid. *International Journal of Biological Macromolecules* 2001; 29: 91-97.
- Unger RE, Wolf M, Peters K, Motta A, Migliaresi C, James Kirkpatrick C.** Growth of human cells on a non-woven silk fibroin net: a potential for use in tissue engineering. *Biomaterials* 2004; 25: 1069-1075.
- Uzawa T, Hori M, Ejiri S, Ozawa H.** Comparison of the effects of intermittent and continuous administration of human parathyroid hormone (1–34) on rat bone. *Bone* 1995; 16: 477-484.
- vandeWitte P, Dijkstra PJ, vandenBerg JWA, Feijen J.** Phase separation processes in polymer solutions in relation to membrane formation. *J. Memb. Sci.* 1996; 117: 1-31.
- Varma MJ, Breuls RG, Schouten TE, Jurgens WJ, Bontkes HJ, Schuurhuis GJ, van Ham SM, van Milligen FJ.** Phenotypical and functional characterization of freshly isolated adipose tissue-derived stem cells. *Stem Cells and Development* 2007; 16: 91-104.
- Vasconcelos A, Freddi G, Cavaco-Paulo A.** Biodegradable materials based on silk fibroin and keratin. *Biomacromolecules* 2008, 9: 1299-1305.
- Vepari C, Kaplan DL.** Silk as a biomaterial. *Progress in Polymer Science* 2007; 32: 991-1007.
- Von Rechenberg B, Uebersax L, Apfel T, Schubotz R, Hilbe M, Meinel L, Kim HJ, Kaplan DL, Merkle HP, Auer JA.** Silk fibroin as an adaptable 3-D scaffold for defect repair in subchondral bone. *European Cells and Materials* 2007; 13: 15-16.
- Vunjak-Novakovic G, Altman G, Horan R, Kaplan DL.** Tissue engineering of ligaments. *Annu Rev Biomed Eng* 2004; 6: 131-156.
- Wan Y, Fang Y, Wu H, Cao X.** Porous polylactide/chitosan scaffolds for tissue. *J Biomed Mater Res A* 2006; 80: 776-789.
- Wang X, Kim HJ, Xu P, Matsumoto A, Kaplan DL.** Biomaterial coatings by stepwise deposition of silk fibroin. *Langmuir* 2005; 21: 11335-11341.
- Wang Y, Blasioli DJ, Kim HJ, Kim HS, Kaplan DL (b).** Cartilage tissue engineering with silk scaffolds and human articular chondrocytes. *Biomaterials* 2006; 27: 4434-4442.

- Wang Y, Kim HJ, Vunjak-Novakovic G, Kaplan DL (a).** Stem cell-based tissue engineering with silk biomaterials. *Biomaterials* 2006; 27: 6064-6082.
- Wang Y, Kim UJ, Blasioli DJ, Kim HJ, Kaplan DL.** In vitro cartilage tissue engineering with 3D porous aqueous-derived silk scaffolds and mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 2005; 26: 7082-7094.
- Wen CM, Ye ST, Zhou LX, Yu Y.** Silk-induced asthma in children: a report of 64 cases. *Annals of Allergy* 1990; 65: 375-378.
- Yang F, Murugan R, Ramakrishna S, Wang X, Ma YX, Wang S.** Fabrication of nano-structured porous PLLA scaffold intended for nerve tissue engineering. *Biomaterials* 2004; 25: 1891-1900.
- Yang G, Zhang LN, Liu YG.** Structure and microporous formation of cellulose/silk fibroin blend membranes, I: Effect of coagulants. *J Membr Sci* 2000; 177: 153-161.
- Yang SH, Chen PQ, Chen YF, Lin FH.** Gelatin/chondroitin-6-sulfate copolymer scaffold for culturing human nucleus pulposus cells in vitro with production of extracellular matrix. *J Biomed Mat Res Part B: Applied Biomaterials* 2005; 74b: 488-494.
- Yannas IV, Lee E, Orgill DP, Skrabut EM, Murphy GF.** Synthesis and characterization of a model extracellular matrix that induces partial regeneration of adult mammalian skin. *Proc Nat Acad Sci U S A* 1989; 86: 933-937.
- Yeo JH, Lee KG, Kim HC, Oh YL, Kim AJ, Kim SY.** The effects of PVA/chitosan/fibroin (PCF)-blended spongy sheets on wound healing in rats. *Biol Pharm Bull* 2000; 23: 1220-1223.
- Yoshimura K, Shigeura T, Matsumoto D, Sato T, Takaki Y, Aiba-Kojima E, Sato K, Inoue K, Nagase T, Koshima I, gonda K.** Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portion of liposuction aspirates. *Journal of Cellular Physiology* 2006; 208: 64-67.
- Young HE, Mancini ML, Wright RP, Smith JC, Black AC, Reagan CR, Lucas PA.** Mesenchymal stem cells reside within the connective tissue of many organs. *Dev Dyn* 1995; 202: 137-144.
- Young HE, Steele TA, Bray RA, Hudson J, Floyd JA, Hawkins K, Thomas K, Austin T, Edwards C, Cuzzourt J, Duenzl M, Lucas PA, Black AC Jr.** Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. *Anat Rec* 2001; 264: 51-62.

- Zhang S.** Fabrication of novel biomaterials through molecular self-assembly. *Nature Biotech* 2003; 21: 1171-1178.
- Zhou CZ, Confalonieri F, Medina N, Zivanovic Y, Esnault C, Yang T, Jacquet M, Janin J, Duguet M, Perasso R, Li ZG.** Fine organization of Bombyx mori fibroin heavy chain gene. *Nucleic Acids Research* 2000, 28: 2413-2419.
- Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Ashjani P, De Ugarte A, Hedrick MH.** Human adipose tissue is a source of multipotent stem cell. *Molecular Biology of the Cell* 2002; 13: 4279-4295.
- Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH.** Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering* 2001; 7: 211-228.
- Zvonic S, Lefevre M, Kilroy G, Floyd ZE, Delany JP, Kheterpal I, Gravois A, Dow R, White A, Wu X, Gimble JM.** Secretome of primary cultures of human adipose-derived stem cells: modulation of serpins by adipogenesis. *Molecular & Cellular Proteomics* 2007; 6: 18-28.

## **RINGRAZIAMENTI**

La realizzazione di questa tesi è stata possibile grazie alla collaborazione multidisciplinare con diverse unità operative. Si ringraziano, dunque, tutti coloro che hanno contribuito con il loro lavoro e supporto, in particolare il dott. Silvio Faragò e il dott. Marcello Gatti della Stazione Sperimentale per la Seta di Milano; dott.ssa Marta Cecilia Tosca e la dott.ssa Barbara Antonioli della Struttura Semplice di Terapia Tissutale dell'Ospedale Niguarda Ca' Granda di Milano; il dott. Federico Bertuzzi del Reparto di Diabetologia e Malattie Metaboliche dell'Ospedale Niguarda Ca' Granda di Milano; il dott. Vittorio Necchi del Centro Grandi Strumenti dell'Università degli Studi di Pavia; la dott.ssa Theodora Chlapanidas e la dott.ssa Giulia Lucconi del dipartimento di Chimica Farmaceutica dell'Università degli Studi di Pavia; le aziende Sanitars S. p. a. di Flero (BS) e Gammatom S. r. l. di Guanzate (CO).