

BIOMATERIALI INNOVATIVI, BIOCOMPATIBILI E BIOMIMETICI IN MEDICINA RIGENERATIVA DEL TESSUTO OSSEO

Marco Tatullo

Tecnologica Research Institute, Biomedical Section, Crotone

I biomateriali sono una delle tre principali componenti della medicina rigenerativa, unitamente alla componente cellulare, principalmente di tipo mesenchimale staminale, e ai diversi fattori di crescita con azione induttiva verso processi proliferativi o differenziativi. I biomateriali indubbiamente svolgono oggi un ruolo fondamentale nella medicina riparativa/rigenerativa, ponendosi come “impalcatura”, tecnicamente *scaffold*, per creare quell’humus rigenerativo che supera i limiti del difetto critico; in alternativa, i biomateriali sono veri e propri impianti, con una loro permanenza in situ, con proprietà differenti e dipendenti da innumerevoli fattori locali e sistemici. I biomateriali possono essere naturali o sintetici e vengono utilizzati in applicazioni mediche per supportare, migliorare o sostituire il tessuto danneggiato o in supporto a una specifica funzione biologica (1). I moderni biomateriali combinano in una singola struttura le tecnologie di bioingegneria, di medicina, di biologia cellulare, di fisica e di chimica pertanto si tratta di strutture la cui complessità è andata nel tempo sempre più acuendosi e perfezionandosi. Il filone di ricerca sui biomateriali è cresciuto significativamente nell’ultimo decennio grazie alle recenti scoperte nell’ingegneria dei tessuti, nella medicina rigenerativa e nella protesica multiorgano. Metalli, ceramiche, plastica, vetro e persino costrutti cellulari o tessuti decellularizzati possono essere utilizzati per creare un biomateriale. Possono avere forme semplici o complesse, geometrie adattative, retro-ingegnerizzate, morfologie ottenute con stampanti o lavorate in modo manuale, possono essere con una *texture* superficiale semplice o complessa, con rivestimenti di fibre, di film, di schiume o di composti chimici a legame variabile. L’enorme e mutevole variabilità che caratterizza questi biomateriali, li rende adatti a fungere da supporto in quasi ogni settore della medicina, diventando protagonisti nella protesica con la creazione di valvole cardiache o protesi d’anca, possono essere usati in implantologia dentale o nella creazione di lenti a contatto. In definitiva, i biomateriali sono la soluzione a molte delle richieste che un organismo danneggiato richiede nelle differenti fasi di riparazione e rigenerazione (2).

Che dall’osservazione della natura si possano trarre nuovi spunti per realizzazioni innovative ed ecosostenibili, è un fatto abbastanza risaputo. L’uomo e la natura sono sempre stati interconnessi, l’uomo ha sempre imparato dalla natura; Il termine “Biomimetismo” (*biomimicking*) indica il ripetere artificialmente alcuni processi o prodotti naturalmente disponibili in piante, minerali, animali o fenomeni naturali: “mimando” i meccanismi che governano la natura, si possono trovare sorprendenti risposte anche a complessi dilemmi biologici e ingegneristici.

Il biomimetismo nasce come branca della tecnologia e trae lezioni dalla natura per sviluppare materiali, processi o strutture artificiali, utilizzata, sia in ambito industriale che architettonico; in realtà, è applicato da molti anni nel design industriale, anche se solo nell’ultimo decennio ha conosciuto un rapido sviluppo. Persino la Torre Eiffel è un esempio straordinario di imitazione di qualcosa già esistente in natura. Quando fu costruita pesava un po’ meno di 7.000 tonnellate, e questo risultato lo si ottenne partendo dagli studi sull’anatomia umana di Hermann von Meyer, che concentrò la sua attenzione sulla struttura degli arti inferiori umani, e in particolare, sul modo in cui il femore si articola con la rotula.

Il biomimetismo è anche un fenomeno presente tra specie differenti, un esempio è la similitudine tra le *perikymata* dello smalto dentale, che sono delle scanalature trasversali e ondulate, ritenute le manifestazioni superficiali delle strie di Retzius, le quali ricordano molto le strie ondulate sulle valve dei mitili bivalve, come se rappresentassero delle “impronte digitali” sulle superfici delle strutture caratterizzate da apposizione minerale metacrona.

La evoluzione dei biomateriali è stata molto incalzante, soprattutto negli ultimi anni. In passato si parlava di materiali “non biologici” che si sono poi evoluti in “Biomateriali” e che a loro volta stanno rapidamente evolvendo in materiali funzionalizzati che interagiscono e “parlano” con i tessuti e le cellule nei quali sono impiantati. Dal concetto di integrazione di un materiale biocompatibile all’interno del corpo umano, si è passato al concetto riparazione e poi rapidamente a quello di rigenerazione di tessuti e organi fino ad arrivare al concetto dell’auto rigenerazione (*self-regeneration*). Questa evoluzione dei materiali ha avuto come supporto fondamentale le nanotecnologie. Per nanotecnologie si intendono quelle tecnologie con la “capacità di lavorare a livello atomico, molecolare e anche sub-molecolare, al fine di creare e utilizzare materiali, dispositivi e sistemi con nuove proprietà e funzioni”. Trasponendo sulle nanotecnologie il concetto di “biomimetismo” è facile intuire che si avranno importanti sviluppi nel campo biomedico. Le nanotecnologie biomimetiche sono una futuribile realtà, che prevede l’utilizzo di tecnologie come i nanotubi, capaci di “costruire” *layer-by-layer* degli organi artificiali anche 100 volte più resistenti di quelli umani. Di grande impatto sono anche le nano-pinze, utili per chelare le molecole in uno specifico punto, creando una estrema selettività nelle chirurgie che da “macro” diventano sempre più micro. Un utilizzo ancora più avveniristico lo si ottiene con la nanocibernetica: una scienza nata per sfruttare circuiti applicati alle scienze biomediche, creando, di fatto, ibridi bio-cibernetici totalmente biomimetici e capaci di sviluppare abilità fisiologiche superiori a quelle normalmente sperimentabili. Infine, riferito al campo odontoiatrico, in concetto di nanotecnologie ha permesso di introdurre il concetto di *Nanodentistry*, che è definibile come “la scienza e la tecnologia per la diagnosi, il trattamento e la prevenzione di patologie orali e dentali, che mirano a ridurre, preservare e migliorare la salute orale attraverso materiali nanostrutturati”.

Ovviamente, ogni branca medica ha la potenzialità di sviluppare il ramo “nano”, con relative applicazioni cliniche e chirurgiche, per esempio, da una collaborazione tra il Dr. Tatullo, direttore del “Tecnologica Research Institute”, e il laboratorio del prof. Gaharwar, afferente alla “Texas University”, si sono sviluppati degli *scaffold* nano-ibridi biomimetici e bioattivi che hanno posto una pietra miliare nella terapia della progressione della malattia osteoporotica. L’osteoporosi è una malattia ossea degenerativa comunemente correlata all’invecchiamento (3). Con un aumento delle aspettative di vita in tutto il mondo, la prevalenza della malattia dovrebbe aumentare. Gli attuali trattamenti terapeutici clinici non sono in grado di offrire soluzioni a lungo termine per contrastare la perdita di massa ossea e l’aumentato rischio di fratture, che sono le caratteristiche principali della malattia. Tuttavia, la combinazione di nanomateriali bioattivi all’interno di uno *scaffold* biomimetico mostra lo sviluppo di un promettente trattamento localizzato a lungo termine per le persone affette da osteoporosi.

Il rischio nell’utilizzare le nanotecnologie sta nel fatto che la loro estrema interattività biologica possa risultare, talvolta, nociva. Per esempio, studi condotti sulla rigenerazione ossea hanno evidenziato in alcune coorti un aumento del rischio di fenomeni trombotici e l’incremento dell’incidenza di patologie oncologiche. Restando in ambito ortopedico, alcuni nanofarmaci danno una buona inibizione degli osteoclasti, che tuttavia si scontra con una pressoché totale assenza di osteogenesi, rendendo importante il rischio di fratture patologiche. Infine, numerosi studi sono in corso sugli aspetti legati alla citotossicità a basse dosi: molte criticità derivano dalla scarsità di *Evidence Based Medicine*, pertanto solo il tempo potrà dare risposte meno confuse su queste tecnologie e questi nanomateriali in utilizzi clinici correnti.

Le nanotecnologie quindi hanno permesso di aprire nuove strade per la progettazione di materiali fondamentali per la medicina e odontoiatria rigenerativa. I tre ingredienti fondamentali in odontoiatria/endodonzia rigenerativa sono: la componente cellulare, gli *scaffold*, e i *growth factors*. La componente cellulare maggiormente immaginifica e rappresentativa delle procedure di ingegneria tissutale è rappresentata dalle cellule staminali. La medicina rigenerativa combina vari aspetti della biologia cellulare e molecolare, unitamente alla scienza dei materiali, per riparare o sostituire i tessuti. La chirurgia orale e la chirurgia maxillo-facciale hanno un ruolo primario nel trattamento di malattie traumatiche o degenerative che portano a una perdita di tessuto nei distretti testa-collo: spesso, per riabilitare questi minus tissutali o di organo, è necessario utilizzare tecniche che sono state implementate nel tempo. La frontiera più studiata e verificata clinicamente dalla medicina rigenerativa oggi giorno è rappresentata dalle cellule staminali mesenchimali (*Mesenchymal Stem Cells*, MSC): le MSC sono senza dubbio il futuro di medicina rigenerativa e stanno mostrando prospettive inimmaginabili solo pochi anni fa (4). Gli studi più recenti mirano alla rigenerazione tissutale utilizzando MSC prelevati da siti ancora più accessibili e ricchi di cellule staminali: la cavità orale si è rivelata un'importante fonte di MSC con il vantaggio di essere facilmente accessibile al chirurgo, evitando così di aumentare la morbilità nei confronti del paziente, come accade nel caso di prelievi in zone poco accessibili e non soggette a sostituzione della parte avulsa. Il futuro è la rigenerazione di interi organi o sistemi biologici costituiti da molti tessuti diversi, a partire da una linea iniziale di cellule staminali, magari utilizzando *scaffold* innovativi insieme alla nanotecnologia dei tessuti biologici.

Oggi giorno, numerosi tipi di MSC sono stati isolati dai denti: nel 2000 le MSC sono state inizialmente isolate da Gronthos *et al.* dalla polpa dentale (*Dental Pulp Stem Cell*, DPSC) (5). Queste cellule possiedono caratteristiche fenotipiche simili a quelle delle cellule contenute nel midollo osseo (*Bone Marrow Stem Cells*, BMSC) e hanno le proprietà staminali tipiche come la capacità di rigenerarsi autonomamente e la capacità di multi-differenziare nei tre foglietti embrionali. Inoltre, le DPSC hanno mostrato abilità di differenziare e rigenerare anche tessuti non orofacciali, infatti, queste cellule sono state differenziate in epatociti, in neuroni, nelle isole pancreatiche, nei miociti e nei cardiomiociti. Successivamente, le MSC sono state isolate anche nella polpa dentale di denti decidui esfoliati umani (*Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous*, SHED) (6). Queste SHED, come le DPSC, hanno la capacità di differenziare *in vitro* in odontoblasti, osteoblasti, adipociti e cellule simili a neuroni (neuron-like cells). Anche le SHED sono state in grado di formare dentina e osso quando impiantate unitamente a *scaffold* osteogenici in modelli in-vivo.

Il legamento parodontale è un'altra fonte di MSC da tessuti adulti, presenti nel distretto orodentale. Le cellule staminali del legamento parodontale (*Periodontal Ligament Stem Cells*, PDLSC) hanno la capacità di rigenerare i tessuti parodontali come il cemento, il legamento parodontale e l'osso alveolare.

Ulteriori MSC sono state anche isolate dai tessuti dentali presenti transitoriamente durante lo sviluppo dell'abbozzo dentario: il follicolo dentale (*Stem Cells from Dental Follicle*, DFPC) e la papilla apicale, per esempio, sono ricchi di queste preziose cellule rigeneratrici. Le DFPC hanno mostrato la capacità di rigenerare i tessuti parodontali prevalentemente, mentre le SCAP (*Stem Cells from Apical Papilla*) dimostrano una migliore proliferazione e una migliore capacità di promuovere la rigenerazione della matrice della dentina quando impiantate in topi immunocompromessi rispetto a DPSC.

Le BMSC non sono cellule staminali facilmente ottenibili per motivi di limitata accessibilità ed elevata dolorabilità. Al contrario, i tessuti dentali e oro-maxillo-facciali sono le fonti di cellule staminali più accessibili. Tuttavia, l'isolamento delle MSC da queste fonti potrebbe richiedere l'estrazione di un dente sano. Inoltre, non tutti gli adulti hanno bisogno dell'estrazione dei denti del giudizio per motivi odontoiatrici o funzionali. Per superare questi limiti, recentemente,

Marrelli *et al.* hanno dimostrato che le MSC isolate da cisti periapicali (*human Periapical Cyst-Mesenchymal Stem Cells*, hPCy-MSc) hanno un profilo immunofenotipico caratteristico delle cellule staminali mesenchimali e hanno mostrato la capacità di differenziarsi nelle linee osteogenica e adipogenica e condrogenica (7). Le cisti periapicali sono un reperto facilmente ottenibile, enucleabile da pazienti con disagio minimo: esso sembra essere una promettente fonte di cellule staminali adulte, con ottime capacità di corroborare procedure cliniche in odontoiatria e chirurgia maxillo-facciale. In effetti, le hPCy-MSc similmente alle DPSC hanno comune derivazione dalle creste neurali, ed esprimono spontaneamente le proteine specifiche dei neuroni e degli astrociti, e i geni correlati al fenotipo neurogenico nel loro stato basale. Inoltre, le hPC-MSc, sotto appropriata stimolazione pro-neurogenica, acquisiscono morfologia neuronale e sovra-esprimono significativamente diversi marcatori neurali, sia a livello proteico che a livello del trascritto primario (8).

La scelta delle cellule staminali adatte trova il suo maggiore impatto con lo *scaffold* più performante, creando in tal modo una eccellente nicchia cellulare.

Gli *scaffold* devono essere assolutamente biocompatibili, e costituire un supporto alla crescita cellulare, possibilmente seguendo le morfologie di sviluppo del tessuto da riparare/rigenerare nelle 3 dimensioni. Essi hanno un ruolo sia passivo, di “impalcatura” e supporto alla rigenerazione, sia un ruolo attivo e dromotropo nella rigenerazione tissutale; inoltre, lo *scaffold* funge da scambiatore di sostanze trofiche, permettendo la sopravvivenza cellulare. Per definizione, gli *scaffold* devono degradare nel tempo la loro struttura, per essere lentamente sostituiti dal tessuto rigenerato.

Le tecnologie di ingegneria diretta e inversa sono oggi molto evolute, creando numerose combinazioni possibili relative alla produzione di *scaffold custom-made*. La tecnologia più innovativa che attualmente può essere utilizzata è il *3D-bioplotting* che permette di avere un’architettura prestabilita e regolare che crea *scaffold* ingegnerizzati con filamenti e pori che presentano una precisione nanometrica.

In letteratura esistono molte forme e composizioni relative agli *scaffold* biomedici: quelli iniettabili sono un mix tra componente solido/particellare e componente liquida. Gli *scaffold* liquidi hanno vantaggi relativi alla manipolabilità, inoltre hanno proprietà meccaniche molto surgeon-friendly, riuscendo a indurirsi entro 15min dalla applicazione nel sito chirurgico.

Lo *scaffold* ideale tende a essere sempre più “self”, in modo da avere maggiori possibilità di integrazione fisiologica: gli *scaffold* a base di matrice extracellulare (ECM) sono una eccellente soluzione ai principali limiti presenti negli *scaffold* più innovativi. Per esempio, gli idrogels derivati dalla matrice extracellulare bovina (*bovine ExtraCellular Matrix*, bECM), producono una morfologia a consistenza gelatinosa capace di accogliere cellule osteocitarie che mantengono la osteoconduttività e che possono essere utilizzati per il riparo e la ricostruzione di numerosi tessuti.

Lo *scaffold* è caratterizzato da una macro- ma anche da una micro-architettura: l’*équipe* del dr. Tatullo ha lavorato e brevettato una tipologia di *scaffold* 3D molto innovativi, creati in collaborazione con la Università di Nottingham: questi *scaffold* 3D rappresentano un esempio di microarchitettura funzionale, che permette il *drug-release* in modo controllato nel tempo. Gli *scaffold* 3D sono stati fabbricati utilizzando delle micro particelle di PLGA (*Poly d,l-Lactic-co-Glycolic Acid*), che si ottengono unendo il PLGA con diclorometano e successivamente con alcol polivinilico. Gli acidi polilattico (*PolyLactic Acid*, PLA), poliglicolico (*PolyGlycolic Acid*, PGA) e i loro copolimeri (PLGA) sono biomateriali dotati di ottima biocompatibilità ed elevato tasso di biodegradabilità. La degradazione di tali polimeri è rapida e avviene principalmente per idrolisi: si ottiene la produzione di monomeri quali acido lattico e acido glicolico, che vengono successivamente metabolizzati nei normali processi fisiologici del corpo umano, data la naturale presenza di questi monomeri nell’organismo. In aggiunta, essi hanno grande versatilità di forma e trama, specialmente nella ricostruzione di grandi difetti sul piano tridimensionale.

La realizzazione di nuovi prodotti protesici composti con copolimeri di PGA e PLA, finalizzati all'uso medicale nella chirurgia ricostruttiva/rigenerativa, si presta a creare innovazione anche nei settori della chirurgia ortopedica e orale.

Tra gli *scaffold* innovativi a maggiore impatto nella microchirurgia, sono di grande interesse i *Self-Assembling Peptides* (SAP).

I SAP derivano dalla spontanea associazione di molecole, sotto un determinato equilibrio, in aggregati strutturali ben definiti e uniti da legami non covalenti. Essendo tuttavia gli *scaffold* auto-assemblanti SAP piuttosto fragili, si è reso necessario l'utilizzo di una tecnica di produzione vicariata dalle nanotecnologie: l'elettrofilatura (*electro-spinning*); l'*elettrospinning* serve per sintetizzare e caratterizzare dei nuovi *scaffold* composti da micro e nano fibre di polimeri quali acido poli-lattico e poli-caprolattone. L'elettrofilatura è una tecnica che consente la produzione di *scaffold* elettrofilati con fibre continue aventi diametri da alcuni micron fino a pochi nanometri.

Tra le varianti degli *scaffold*, sono molto discussi in letteratura i derivati da concentrati piastrinici, i quali possono essere classificati come "biomatrici". Gli esempi maggiormente riportati in biomedicina sono: il PRP (*Platelets-rich Plasma*) e il PRF (*Platelets-rich Fibrin*), tra questi, notevole interesse lo ha riscontrato il PRF. Il PRF negli studi in-vitro e in-vivo ha mostrato di avere la capacità di regolare l'infiammazione locale, di stimolare la chemiotassi immunitaria, di promuovere la stabilità del coagulo e di accelerare il timing di guarigione della ferita chirurgica. Infine, in associazione con innesti ossei, il PRF sembra accelerare la formazione di nuovo osso e sembra migliorare la vascolarizzazione dei tessuti molli sovrastanti. (9)

Come concetti innovativi associati agli *scaffold*, troviamo il concetto della "multipotenza" sviluppato anche dal team del dr. Tatullo in una collaborazione con il team della UPMC di Parigi. La multipotenza degli *scaffold* è un concetto applicabile a ogni tessuto. Gli *scaffold* acellulari dei muscoli scheletrici (*Muscle Acellular Scaffold*, MAS), per esempio, sono stati prodotti, innestati e colonizzati da cellule muscolari in un sito a interfaccia tra osso e muscolo, evidenziando l'importanza dell'ambiente nel dirigere l'*homing* e il differenziamento cellulare. I risultati dello studio svolto dal team Tecnologica Research Institute e UPMC rivelano la multipotenza dei MAS e indicano il potenziale di questa nuova tecnica come uno strumento prezioso nella rigenerazione del tessuto muscolo-scheletrico (10, 11).

Infine, una importante linea generale di ricerca è quella di catalizzare la rigenerazione verso quei fenotipi più ostici da ottenere, come quelli relativi al sistema nervoso centrale: questa linea di ricerca è stata percorsa dal team del Dr. Tatullo, il quale ha utilizzato il citotipo innovativo rappresentato dalle hPCy-MSC. In un recente studio pubblicato sul Journal of Dental Research, il team del Dr. Tatullo ha dimostrato per la prima volta che le hPC-MSC hanno una predisposizione verso il fenotipo neuronale, tale predisposizione viene incentivata se le hPCy-MSC vengono esposte a stimoli induttivi verso il fenotipo neuronale, grazie alla up-regolazione di un set completo di proteine e geni che caratterizzano le cellule neuronali. In conclusione, i risultati di questo studio hanno creato i presupposti per ipotizzare terapie basate su cellule staminali differenziate, finalizzate al trattamento di malattie neurologiche. Questa ricerca, ha posto le basi per riutilizzare parte delle cisti dentali, un comune reperto patologico destinato a essere stoccato nei rifiuti biologici, per reperire cellule staminali, che poi andremo a trasformare in neuroni dopaminergici capaci di produrre melanina, esattamente gli stessi neuroni che vengono attaccati nel Morbo di Parkinson: in questo modo, possiamo pensare a un futuro utilizzo di questi modelli sperimentali in *trial* terapeutici innovativi.

Bibliografia

1. Tatullo M, Marrelli M, Paduano F. The regenerative medicine in oral and maxillofacial surgery: the most important innovations in the clinical application of mesenchymal stem cells. *Int J Med Sci* 2015;12(1):72-7.
2. Tatullo M, Marrelli M, Falisi G, *et al.* Mechanical influence of tissue culture plates and extracellular matrix on mesenchymal stem cell behavior: A topical review. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2016;29(1):3-8.
3. Barry M, Pearce H, Cross L, Tatullo M, Gaharwar AK. Advances in nanotechnology for the treatment of osteoporosis. *Curr Osteoporos Rep* 2016;14(3):87-94.
4. Tatullo M, Falisi G, Amantea M, Rastelli C, Paduano F, Marrelli M. Dental pulp stem cells and human periapical cyst mesenchymal stem cells in bone tissue regeneration: comparison of basal and osteogenic differentiated gene expression of a newly discovered mesenchymal stem cell lineage. *J Biol Regul Homeost Agents* 2015;29(3):713-18.
5. Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. *Postnatal human dental pulp stem cells (dpSCs) in vitro and in vivo.* Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america 2000;97:13625-30.
6. 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* 2003;100:5807-812.
7. Marrelli M, Paduano F, Tatullo M. Cells isolated from human periapical cysts express mesenchymal stem cell-like properties. *Int J Biol Sci* 2013;9(10):1070-8.
8. Marrelli M, Paduano F, Tatullo M. Human periapical cyst-mesenchymal stem cells differentiate into neuronal cells. *J Dent Res* 2015;94(6):843-52.
9. Tatullo M, Marrelli M, Cassetta M, Pacifici A, Stefanelli LV, Scacco S, Dipalma G, Pacifici L, Inchingolo F. Platelet Rich Fibrin (P.R.F.) in reconstructive surgery of atrophied maxillary bones: clinical and histological evaluations. *Int J Med Sci* 2012;9(10):872-80.
10. Aulino P, Costa A, Chiaravalloti E, *et al.* Muscle extracellular matrix scaffold is a multipotent environment. *Int J Med Sci* 2015;12(4):336-40.
11. Perniconi B, Coletti D, Aulino P, *et al.* Muscle acellular scaffold as a biomaterial: effects on C2C12 cell differentiation and interaction with the murine host environment. *Front Physiol* 2014;5:354.