

Riassunto

Le lesioni della cartilagine articolare non possono guarire spontaneamente a causa della mancanza di vascolarizzazione e della bassa attività metabolica dei condrociti residenti. Attualmente, le terapie disponibili si limitano solo a contrastare i sintomi infiammatori senza promuovere la guarigione della cartilagine. L'ingegneria dei tessuti potrebbe rappresentare una valida opzione di trattamento per i pazienti affetti da tali disturbi. Tuttavia, ad oggi, le terapie cellulari non sono ancora risolutive e presentano diverse problematiche tecniche, in particolare per quanto riguarda il prelievo delle cellule e la loro espansione *in vitro* prima del trapianto nel sito della lesione.

La scelta di un supporto adeguato per le colture *in vitro* riveste un ruolo fondamentale nella promozione di una proliferazione e differenziazione cellulare efficace. Tra i vari biomateriali disponibili, quelli a base di collagene si distinguono come il migliore supporto per ospitare condrociti o cellule staminali, grazie alla loro somiglianza con la matrice extracellulare (ECM) naturale. Pertanto, gli scaffold basati su collagene sono oggetto di approfondite indagini come valida alternativa per l'ingegneria condrogenica *in vitro* di cellule staminali umane, con l'obiettivo di applicazioni cliniche future.

In questo lavoro di tesi, si è sviluppato uno scaffold tridimensionale bioingegnerizzato innovativo per l'induzione e il mantenimento del fenotipo condrogenico tramite l'incorporazione di cellule staminali mesenchimali derivate dal midollo osseo umano (hBM-MSCs) in un idrogel di collagene di tipo I funzionalizzato insieme a vettori biopolimerici per il rilascio controllato del fattore di crescita trasformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), un induttore condrogenico ben consolidato.

Inizialmente, è stata investigata la concentrazione ottimale di TGF- $\beta 1$ nel terreno di coltura al fine di indurre in modo efficace la condrogenesi delle hBM-MSCs utilizzando metodi standard di coltura bidimensionali. Le cellule coltivate in un terreno arricchito con una concentrazione di 10 ng/mL di

TGF- β 1 hanno mostrato un'incrementata espressione genica correlata alla condrogenesi (SOX9, 4 volte; COL2A1, 2 volte) e una maggiore produzione proteica (collagene di tipo II, 2,74 volte) dopo 16 giorni. Tuttavia, si è osservata anche un'elevata espressione di citochine pro-infiammatorie (IL-12A, 6 volte) nelle cellule trattate. Una volta ottimizzate le condizioni di coltura, si è impiegato un approccio 3D ad alta densità per l'impegno chondrogenico delle hBM-MSCs, poiché le colture bidimensionali promuovono la dedifferenziazione cellulare e un'evoluzione verso un fenotipo fibroblastico. Sono stati assemblati sferoidi 3D ad alta densità utilizzando MSCs derivate dal midollo osseo o dalla gelatina di Wharton (WJ), una fonte alternativa di cellule staminali. Tale condizione di coltura ha promosso una sovraespressione più marcata di tutti i geni e le proteine condrogeniche rispetto all'approccio 2D, probabilmente grazie agli effetti sinergici tra il rilascio di TGF- β 1 e la coltura ad alta densità che favorisce i contatti cellula-cellula. Inoltre, si è dimostrato che le WJ-MSCs potrebbero rappresentare una buona alternativa per i modelli 3D nell'ingegneria del tessuto cartilagineo. Successivamente, le hBM-MSCs sono state coltivate in un idrogel di collagene funzionalizzato con vettori di acido polilattico-co-glicolico (PLGA-MCs) carichi di TGF- β 1, al fine di fornire un ambiente tridimensionale biomimetico per promuovere l'impegno condrogenico delle cellule staminali. Le cellule sono state coltivate sia in condizioni statiche che dinamiche utilizzando un bioreattore a perfusione, e l'effetto sull'impegno condrogenico è stato studiato. I risultati hanno dimostrato che la condrogenesi è stata indotta solo in condizioni di perfusione, con un aumento di 5 volte dell'espressione del gene COL2A1. Infine, per migliorare le proprietà meccaniche e la resistenza enzimatica dell'idrogel di collagene, è stato sintetizzato uno scaffold composito innovativo utilizzando collagene di tipo I equino e acido ialuronico attraverso una reazione in fase eterogenea.

In conclusione, i dati proposti nella tesi propongono nuove prospettive per l'uso clinico di scaffold a base di collagene e di nanovettori polimerici come strumenti rigenerativi per la guarigione delle lesioni della cartilagine.