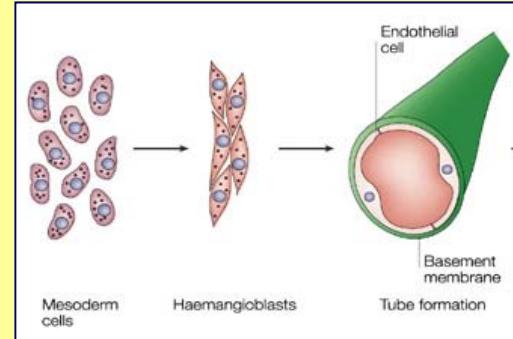


Vascolarizzazione di Scaffold

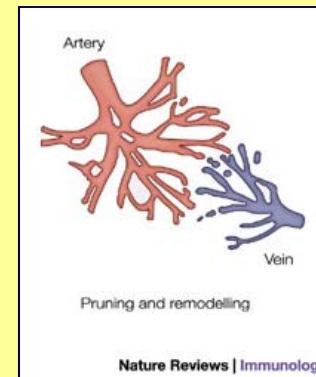
Ingegneria dei Tessuti
31/10/017

In vivo

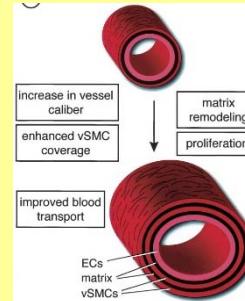
1. Vasculogenesis



2. Angiogenesis

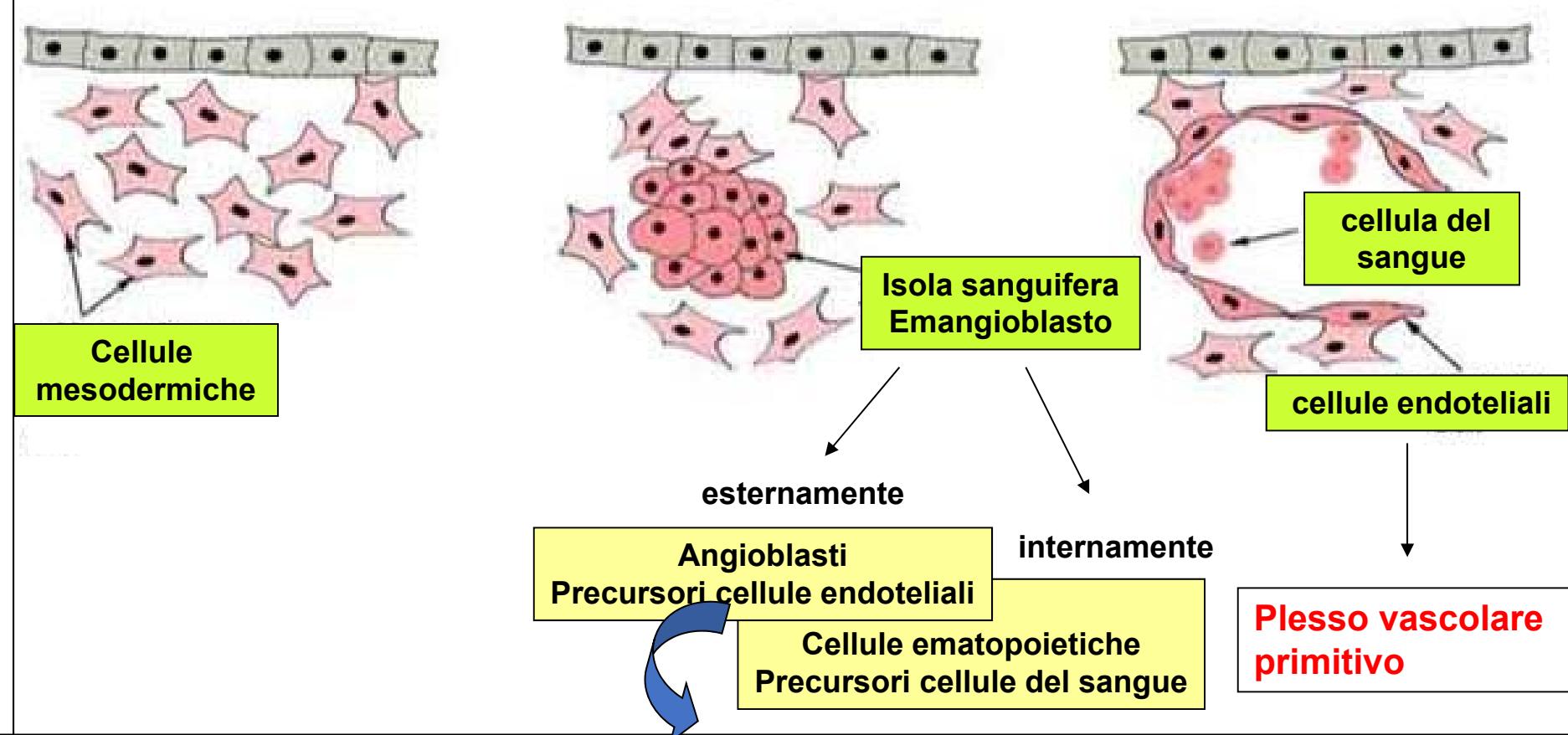


3. Arteriogenesis



VASCULOGENESI

Processo di formazione di vasi a partire dai precursori mesodermici delle cellule endoteliali

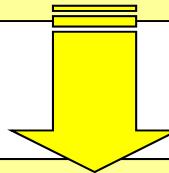


Esse sono definite come cellule che hanno la potenzialità di differenziare in cellule endoteliali ma non hanno ancora markers specifici

PLASTICITÀ FENOTIPICA delle CELLULE ENDOTELIALI

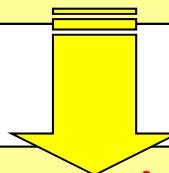
Stato quiescente vs Stato angiogenico

Durante lo sviluppo embrionale e postnatale la proliferazione delle cellule endoteliali è cospicua, per ridursi o cessare del tutto nell'adulto.



L'endoteli nel adulto, sebbene sia metabolicamente attivo, si dice essere in uno **stato quiescente** per il basso turnover cellulare.

Diverse condizioni fisiopatologiche inducono l'attivazione del processo angiogenico

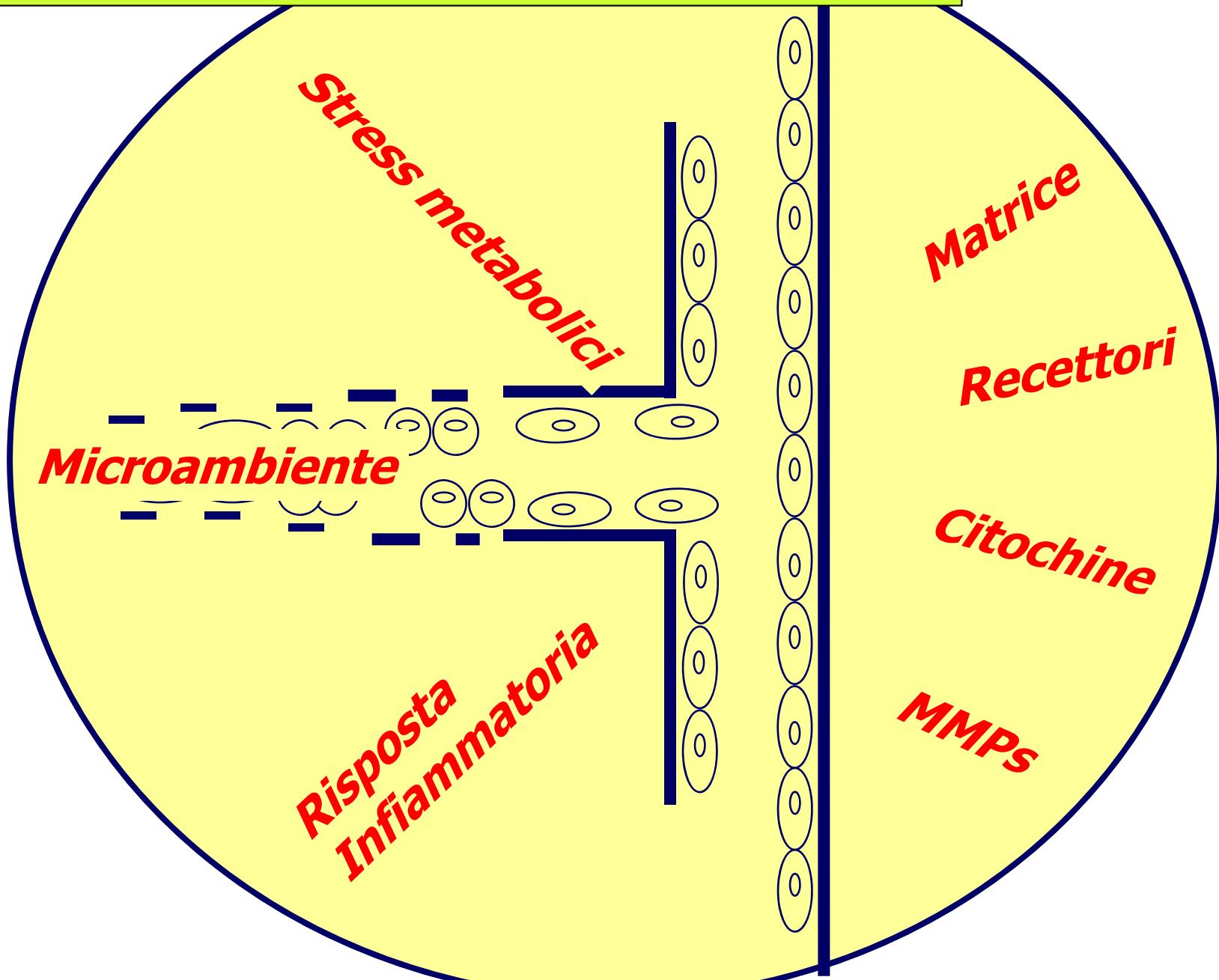


L'endoteli si dice essere in uno **stato angiogenico** per il rapido turnover cellulare

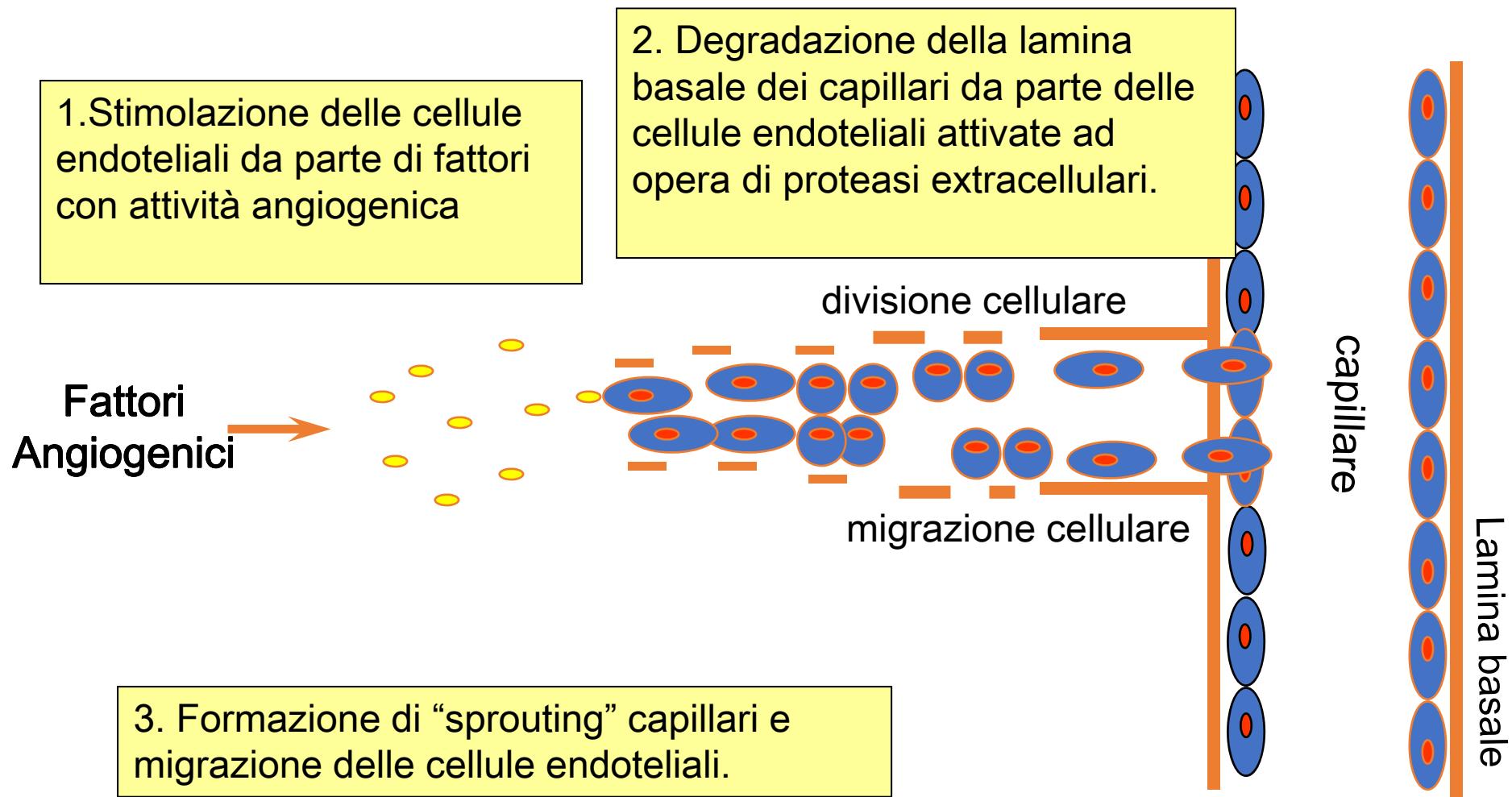
Marcatori cellule endoteliali

Surface markers	Endothelial progenitor cell	Vessel wall endothelium
VEGFR-2 (flk-1)	+	+
VEGFR-3 (flt-4)	?	+
VEGFR-1 (flt-1)	?	+
Tie-2	?	+
VE-cadherin	+	+
CD34	++	+
Ac. LDL uptake	+	+
PECAM (CD31)	+	+
AC133	+	-
vWF	-	+
CD105	+	+
CD36	?	+
PIH12 (CD146)	?	+
Trombomodulin	?	+
E-selectin	?	+
Weidel-Palade bodies	+	+
Tie-1	+	+
Thy-1	+	+
UEA-1	+	+
αv integrin	+	+

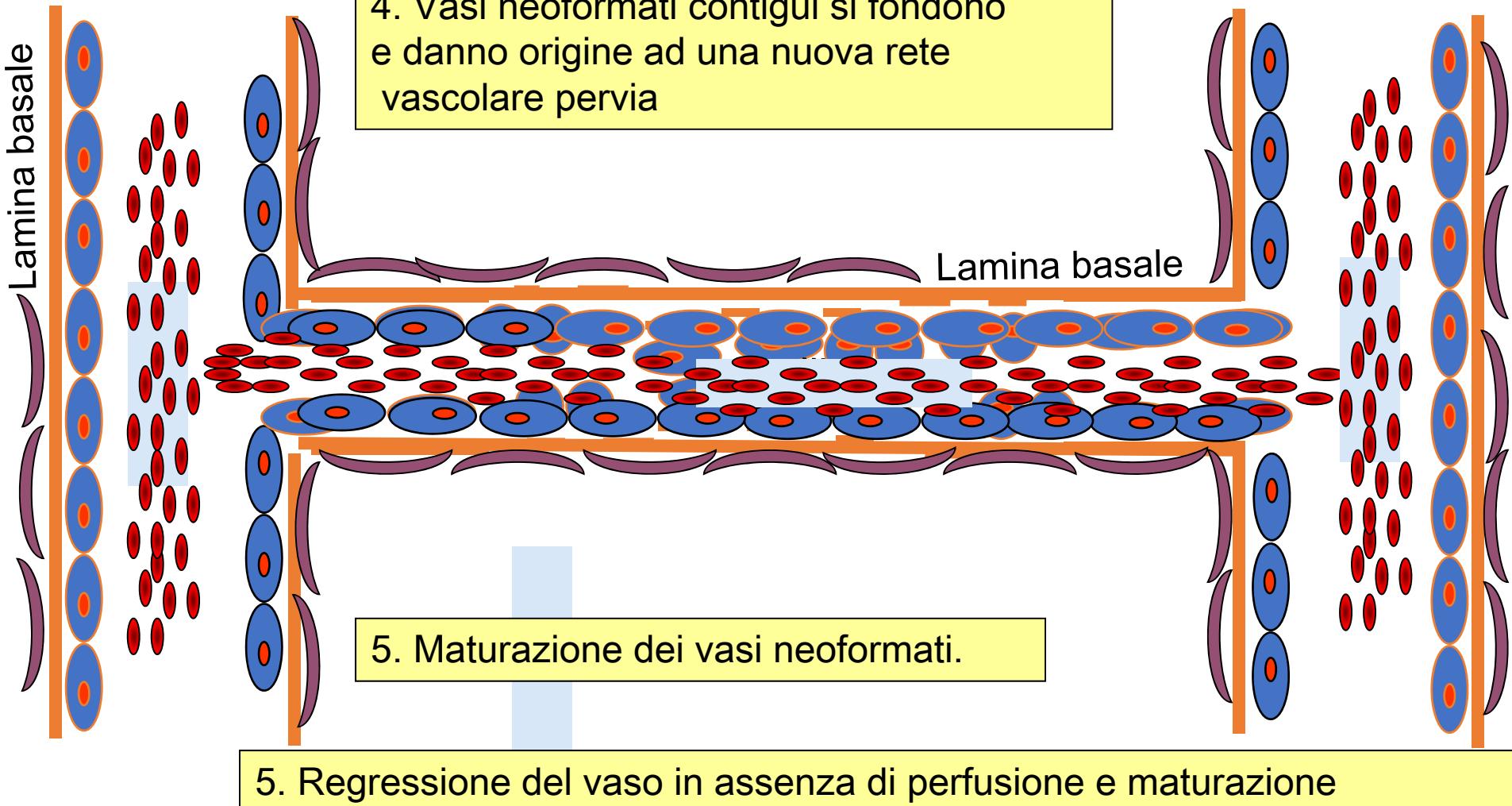
Condizioni che attivano l'angiogenesi...



“Sprouting” angiogenico: un processo “multi-step”



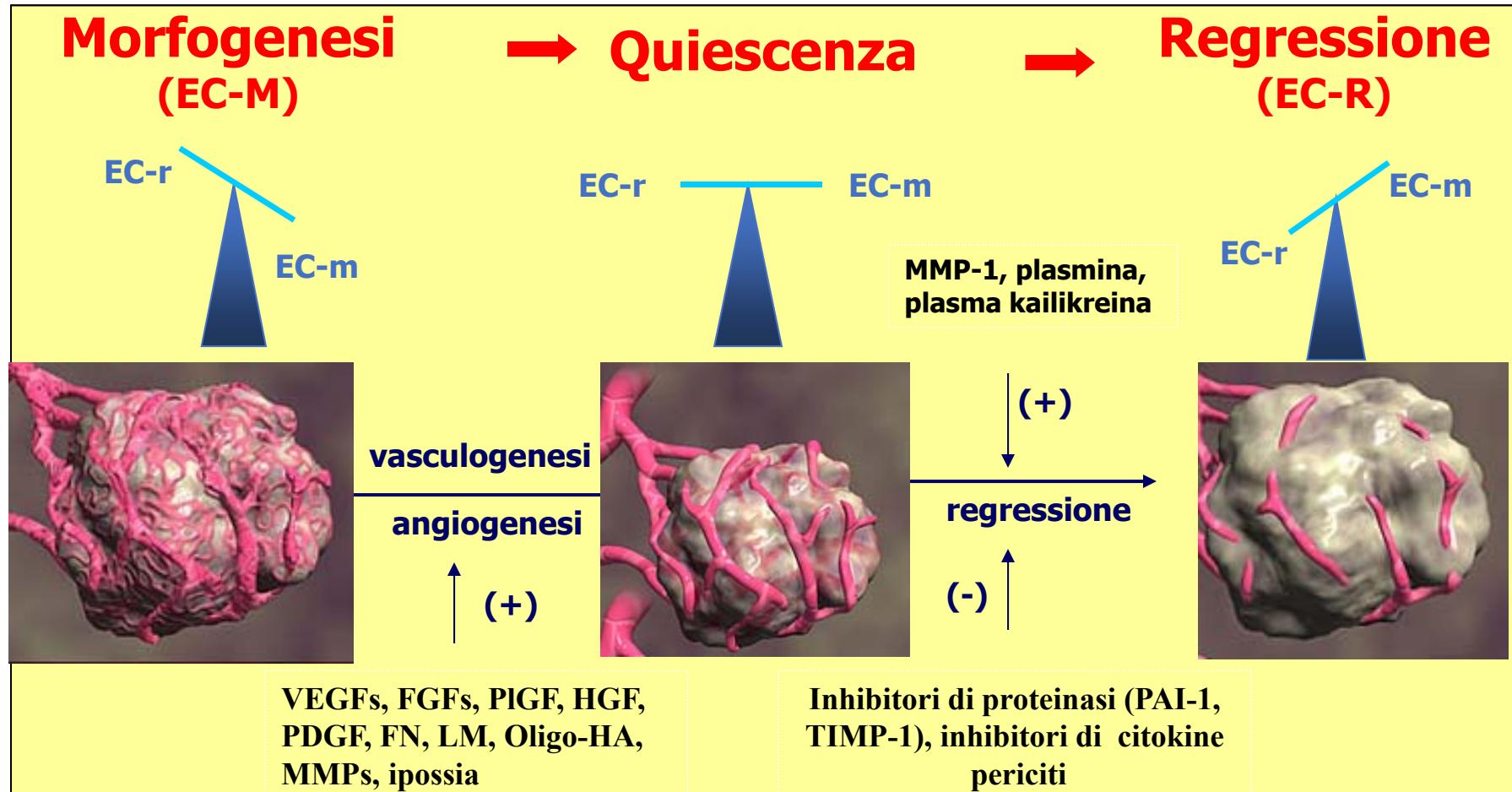
“Sprouting” angiogenico: un processo “multi-step”



Ciascuna fase del processo coinvolge specifici fattori

REGOLAZIONE DELLA MORFOGENESI ENDOTELIALE

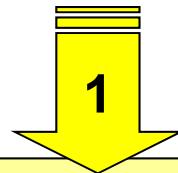
BILANCIO ANGIOGENICO



L'espressione temporale e spaziale di questi fattori è ben coordinata durante il processo di angiogenesi

Davis, *The anatomical Record*, 2002

Passaggio da stato quiescente a stato angiogenico



Attivazione delle cellule endoteliali da parte di citochine e fattori di crescita



Modificazione della lamina basale subendoteliale



Modificazione dell'espressione delle integrine

Attivazione delle cellule endoteliali da parte di citochine e fattori di crescita

VEGF

Fattore di crescita dell'endotelio vascolare

Fattore di permeabilità vascolare

bFGF

Fattore di crescita dei fibroblasti

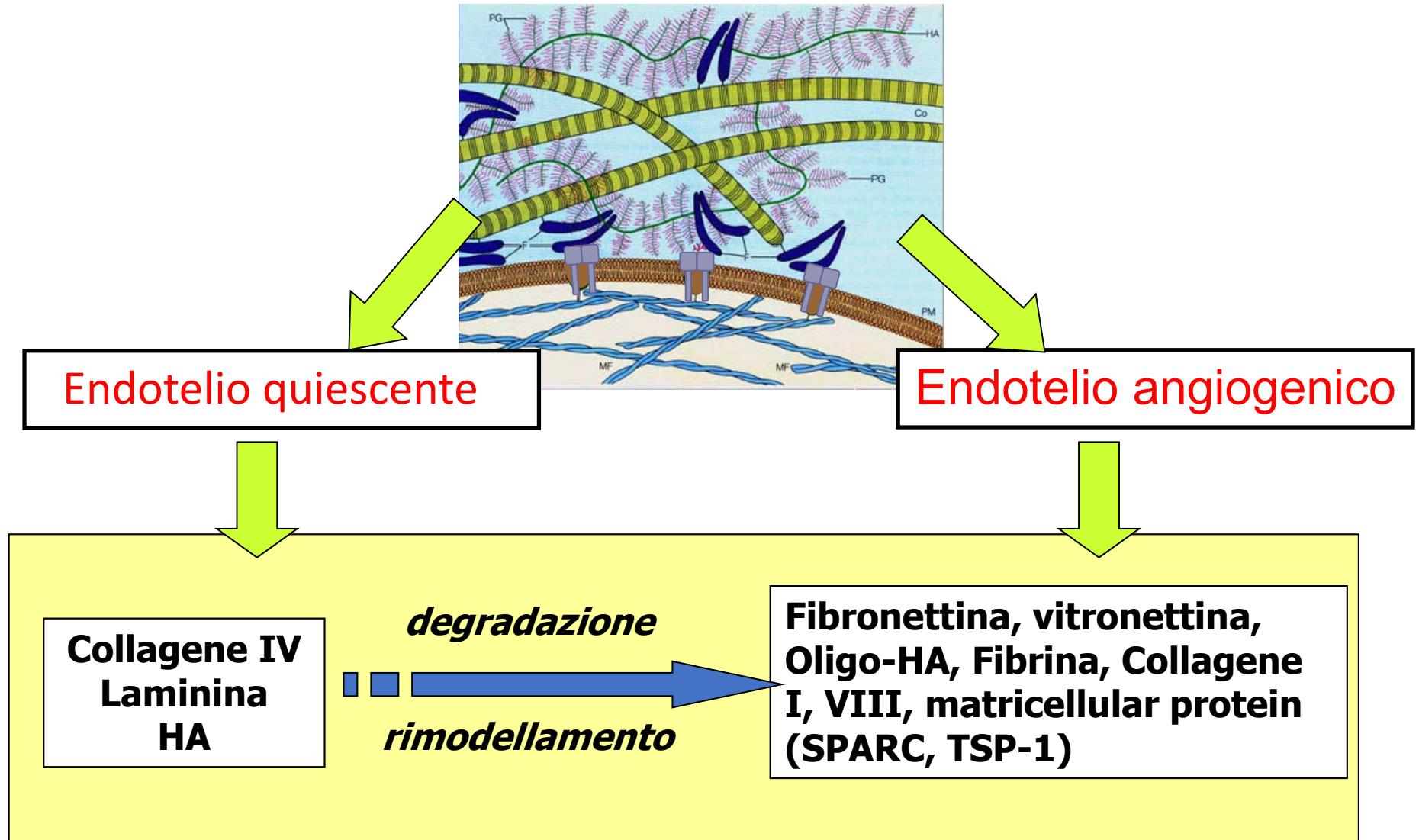
PIGF

Fattore di crescita placentale

PDGF

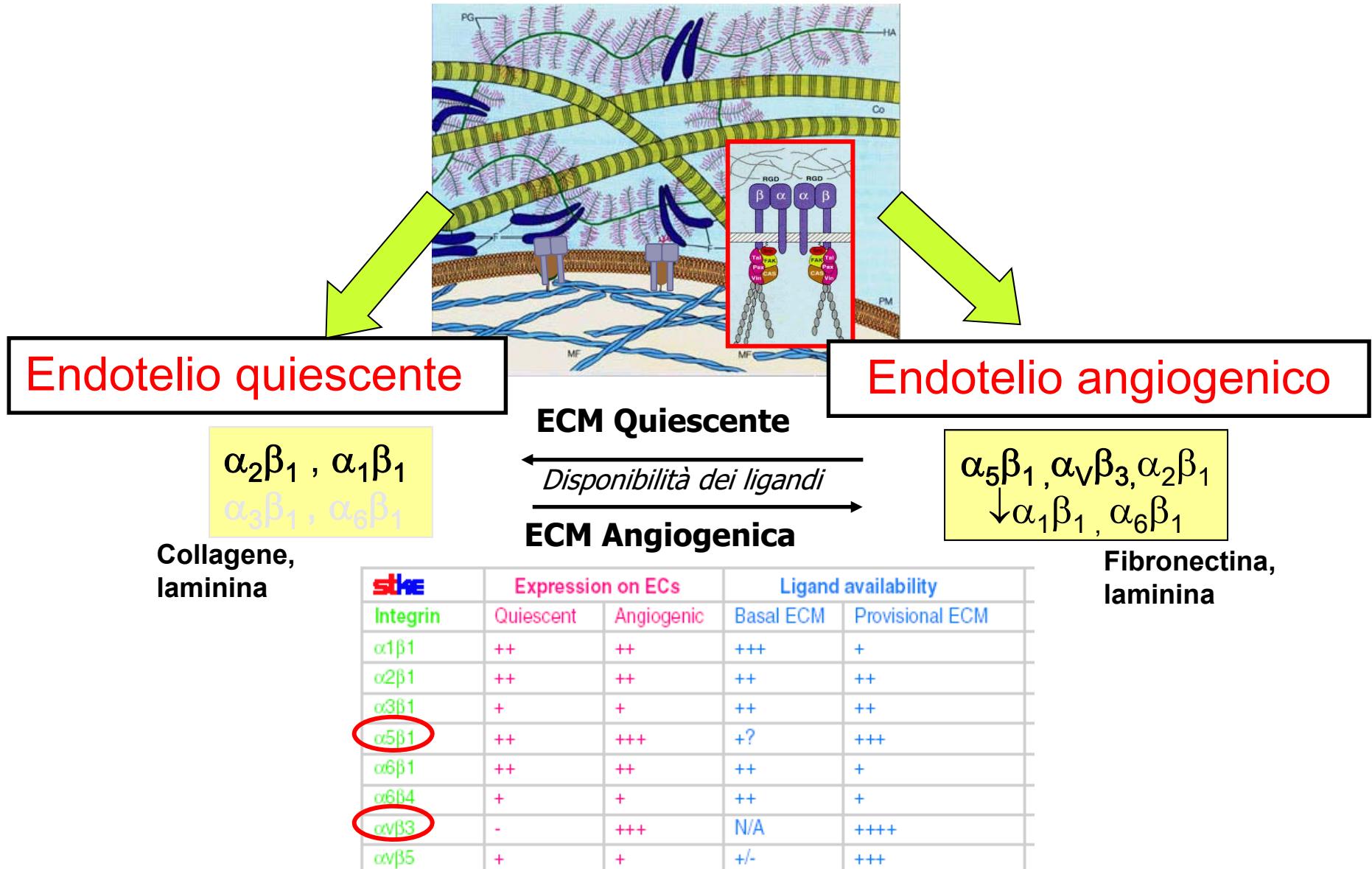
Angiogenina

Modificazione della LAMINA BASALE subendoteliale

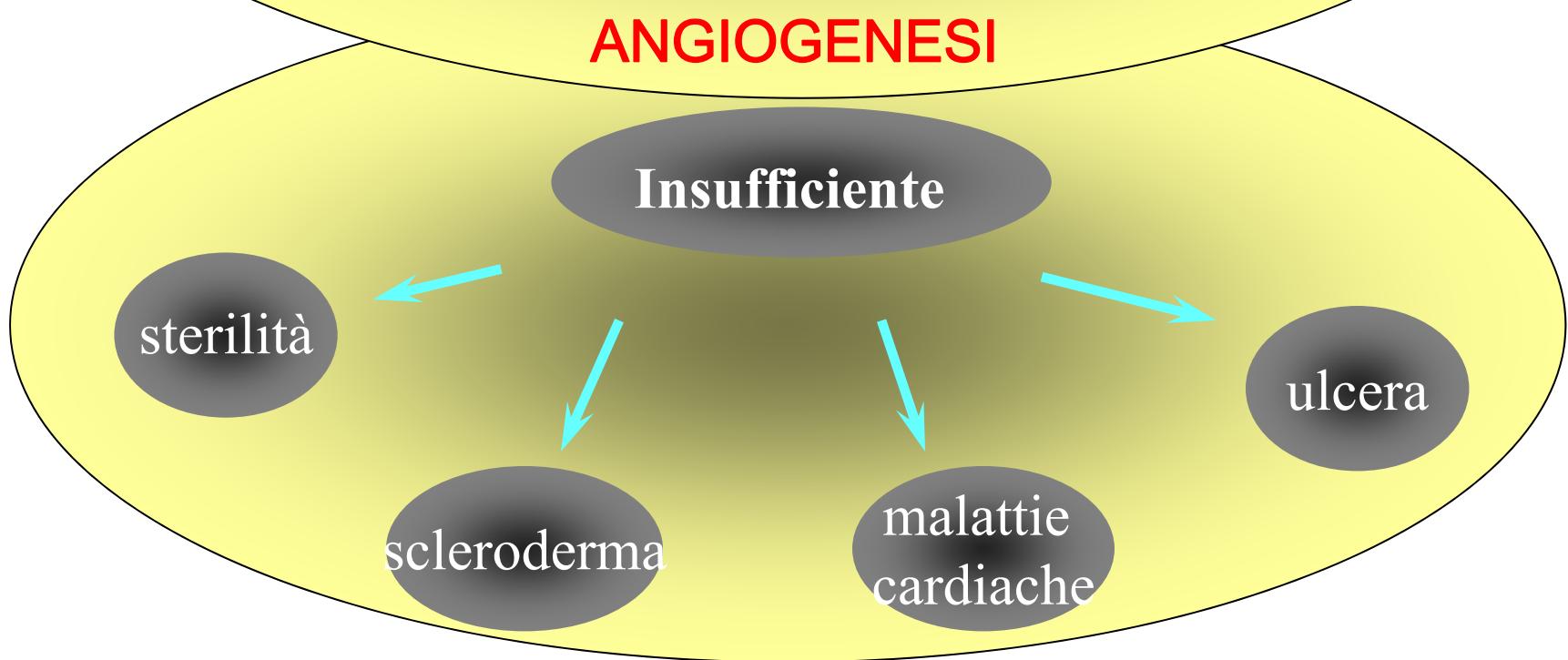
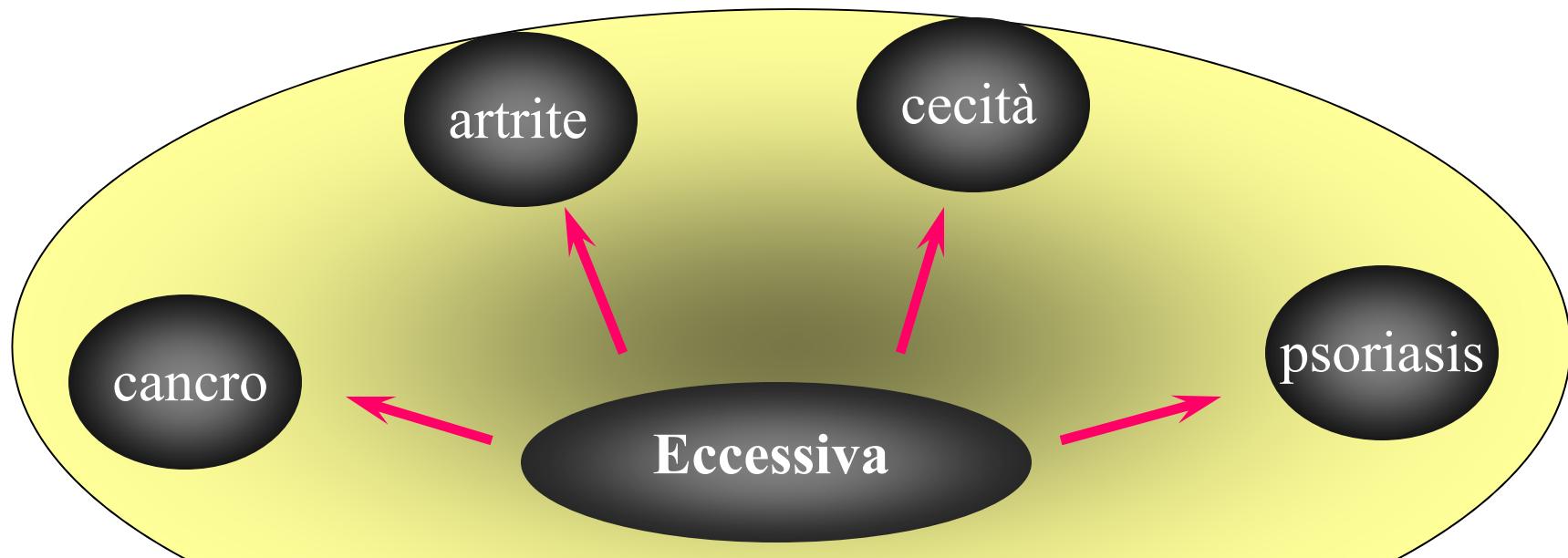


Stupack, D G. 2002 ; Bischoff, J. 1995

Modificazione dell'espressione delle INTEGRINE



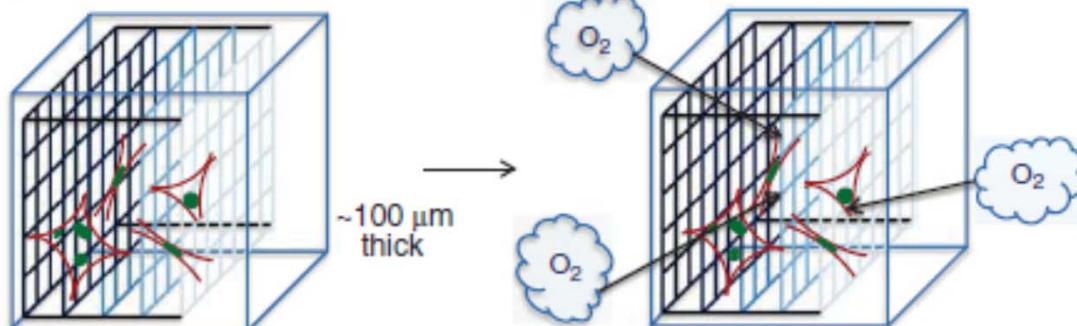
Stupack, 2002



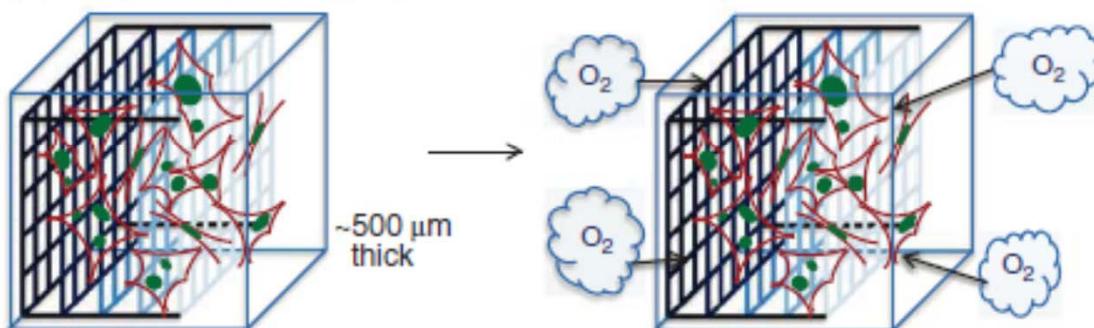
Vascolarizzazione in ingegneria dei tessuti

Vascolarizzazione di matrici polimeriche

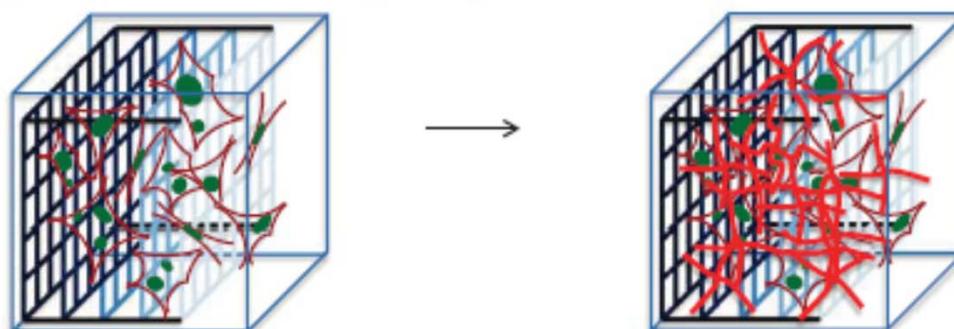
(a) Early stages of tissue formation



(b) Tissue growth and development



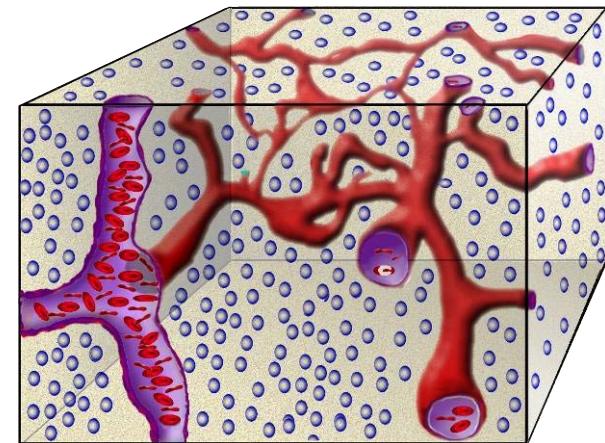
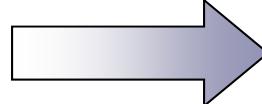
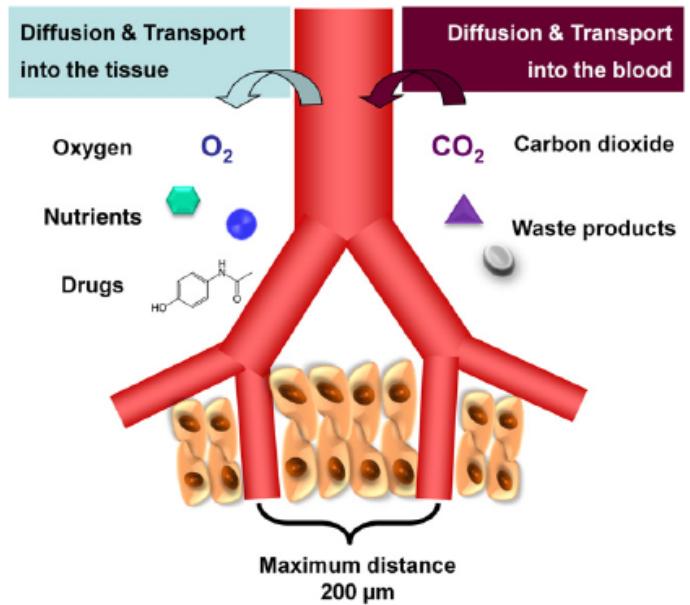
(c) Vascularization for tissue engineering



Vascolarizzazione di matrici polimeriche

PERCHE'?

Le cellule richiedono ossigeno e nutrienti per la loro sopravvivenza



La mancanza di vascolarizzazione rappresenta il principale limite dell'ingegneria dei tessuti

La vascolarizzazione è indispensabile per il successo di impianti di ingegneria tessutale

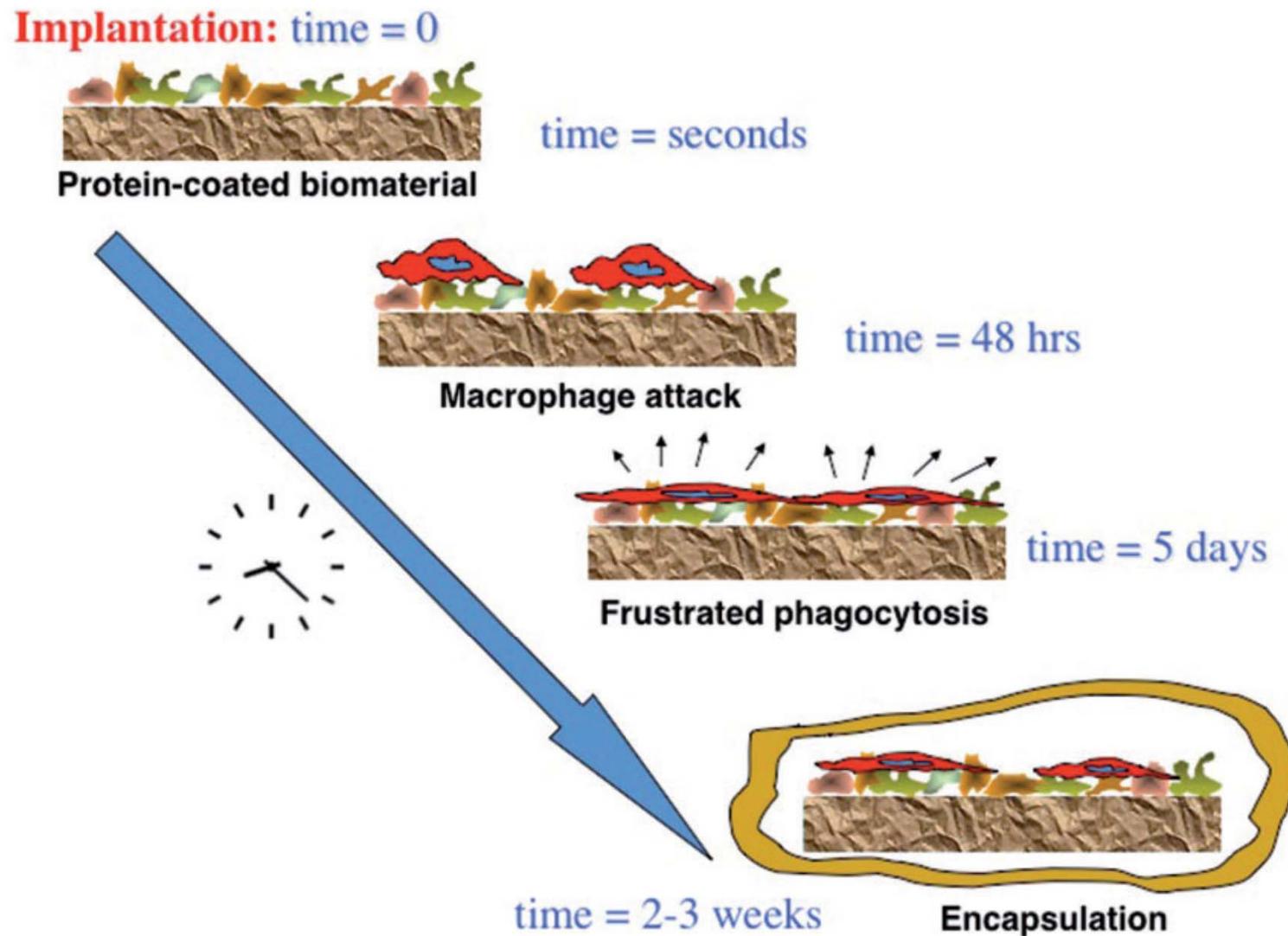
Approcci per una rapida vascolarizzazione di impianti

- ✓ Progettazione e struttura dello scaffold
- ✓ Rilascio/Modulazione fattori angiogenici
- ✓ Fattori matricellulari
- ✓ Reti di vasi sanguigni preformate *in vitro*
- ✓ Scaffold seminati con precursori di cellule endoteliali
- ✓ Reti di vasi sanguigni artificiali

Vascolarizzazione rapida di biomateriali

La formazione di vasi negli scaffold può essere CONTROLLATA e GUIDATA da un'appropriata progettazione dello scaffold e dal rilascio e l'esposizione di stimoli bioattivi.

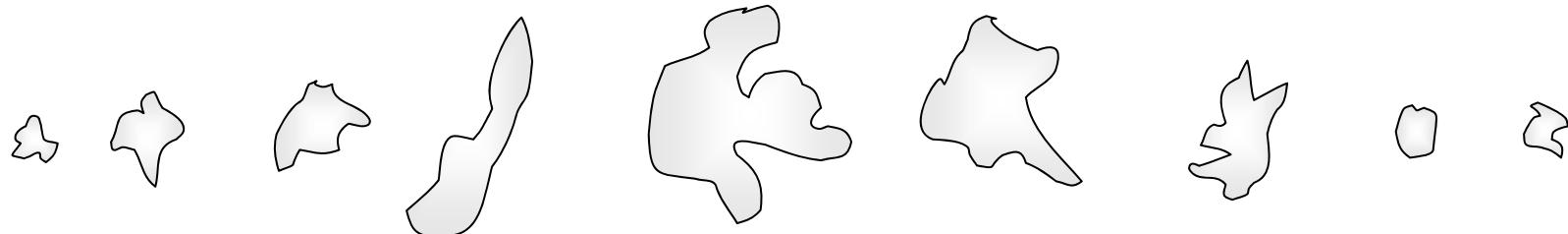
Ruolo della dimensione e della distribuzione dei pori nella vascolarizzazione di scaffold



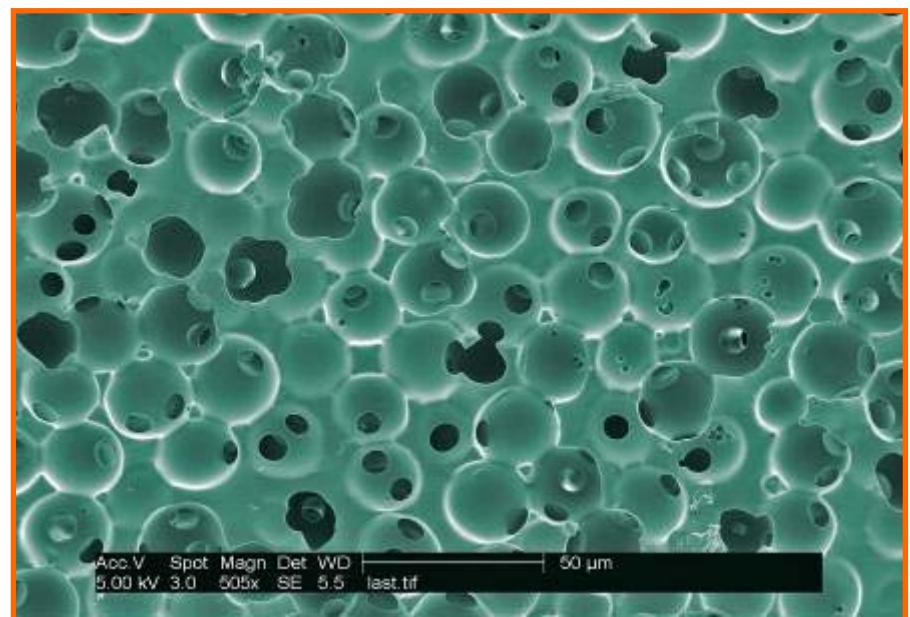
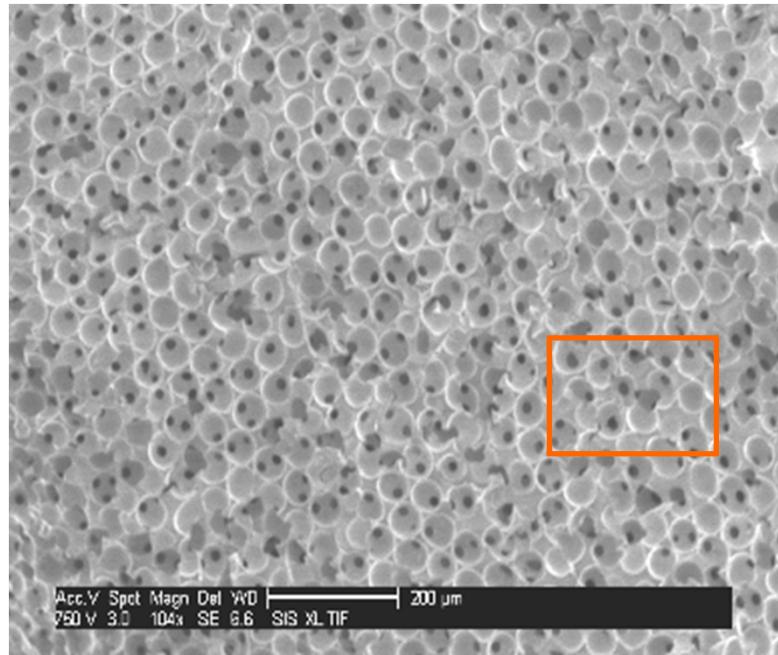
Ruolo della dimensione e della distribuzione dei pori nella vascolarizzazione di scaffold

Qual è la dimensione dei pori ottimale?

In IT la porosità di uno scaffold varia per distribuzione, dimensione e forma dei pori.



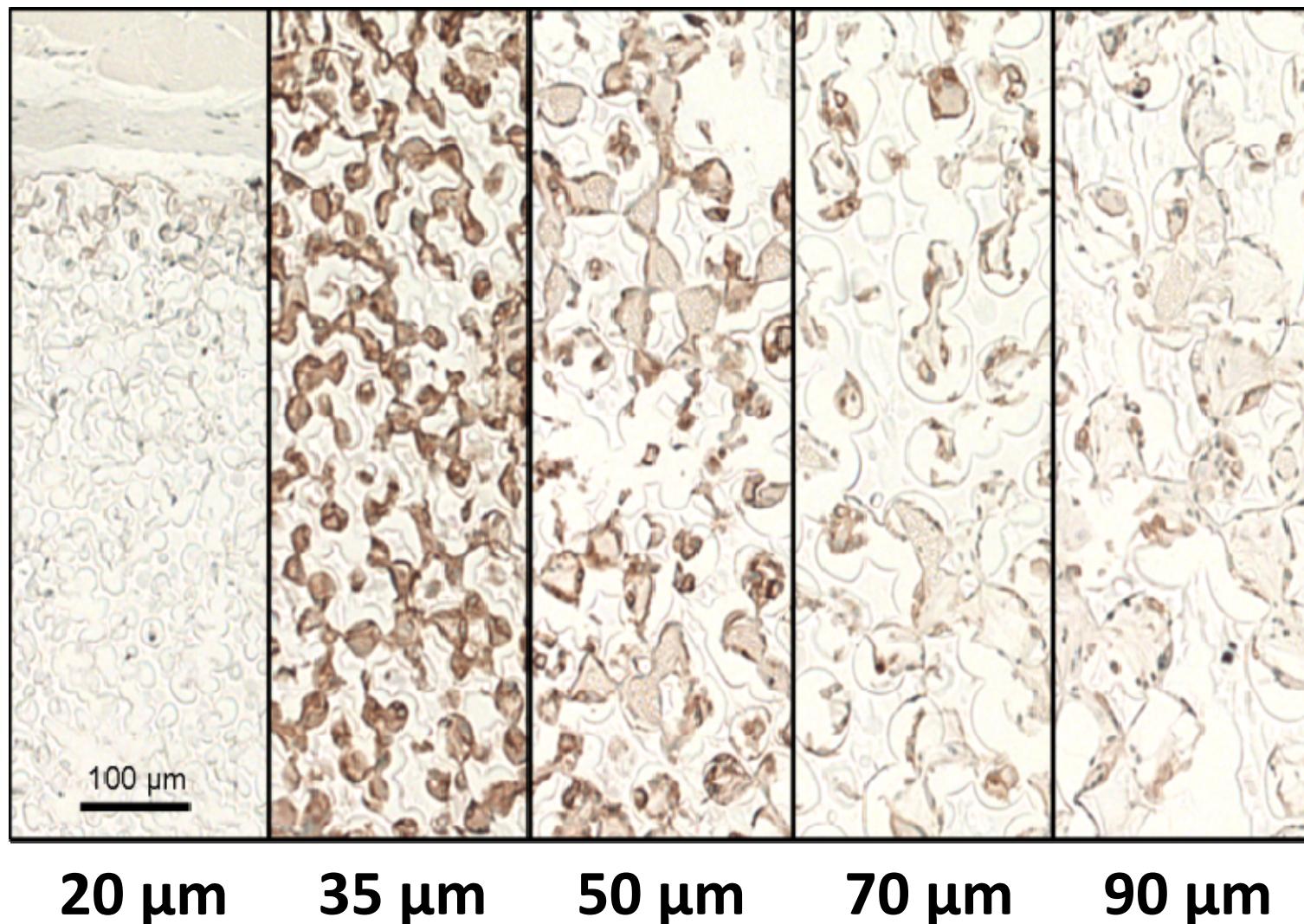
Scaffold 3D porosi con una stretta distribuzione della dimensione dei pori



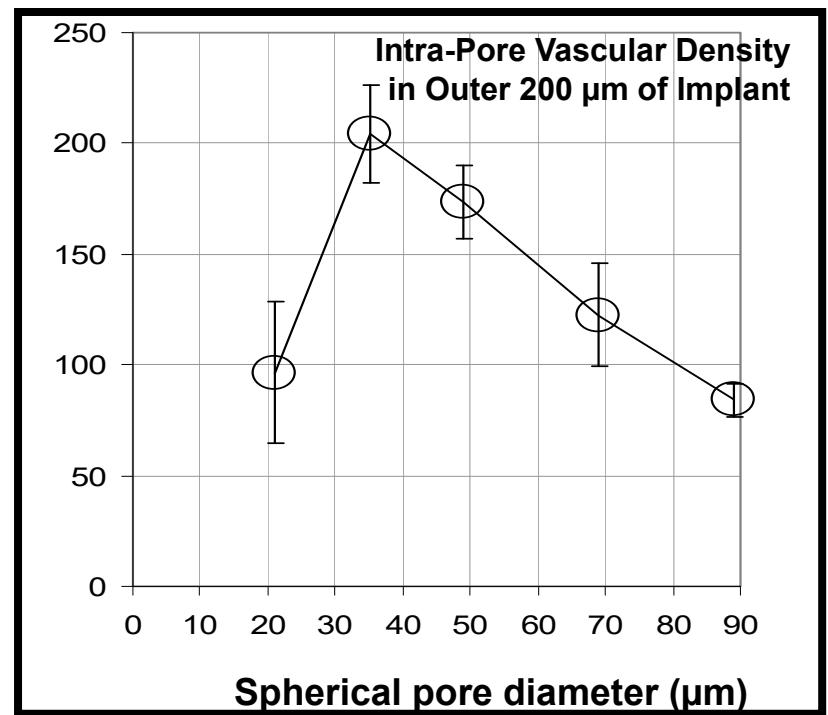
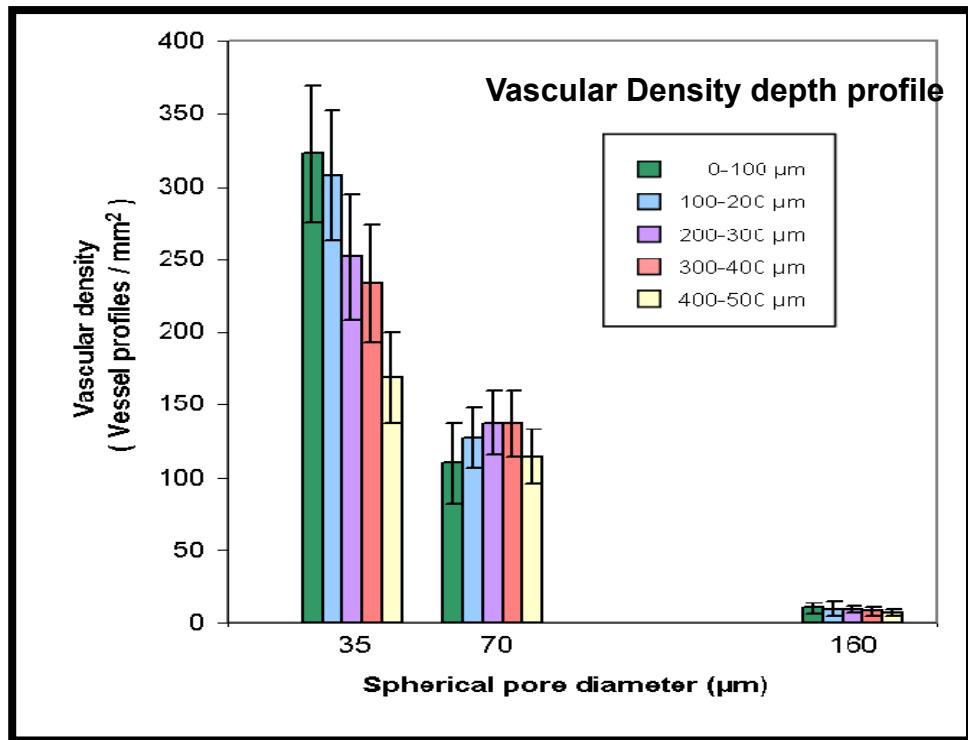
Sphere-Templated Hydrogels

Marshall, AJ,

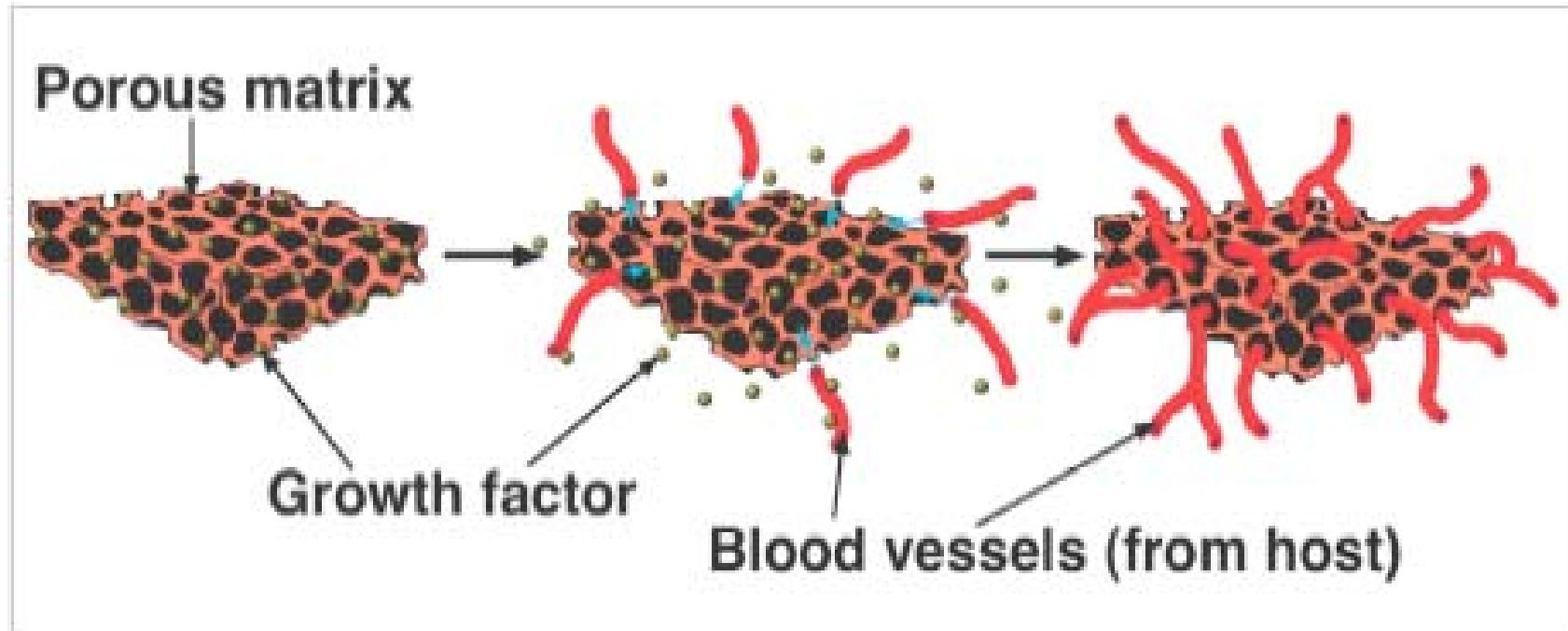
Dimensione dei pori e vascolarizzazione



Dimensione dei pori e vascolarizzazione



Come si possono ottenere vasi sanguigni migliori?



(Lee and Mooney, Chem. Rev., 2001)

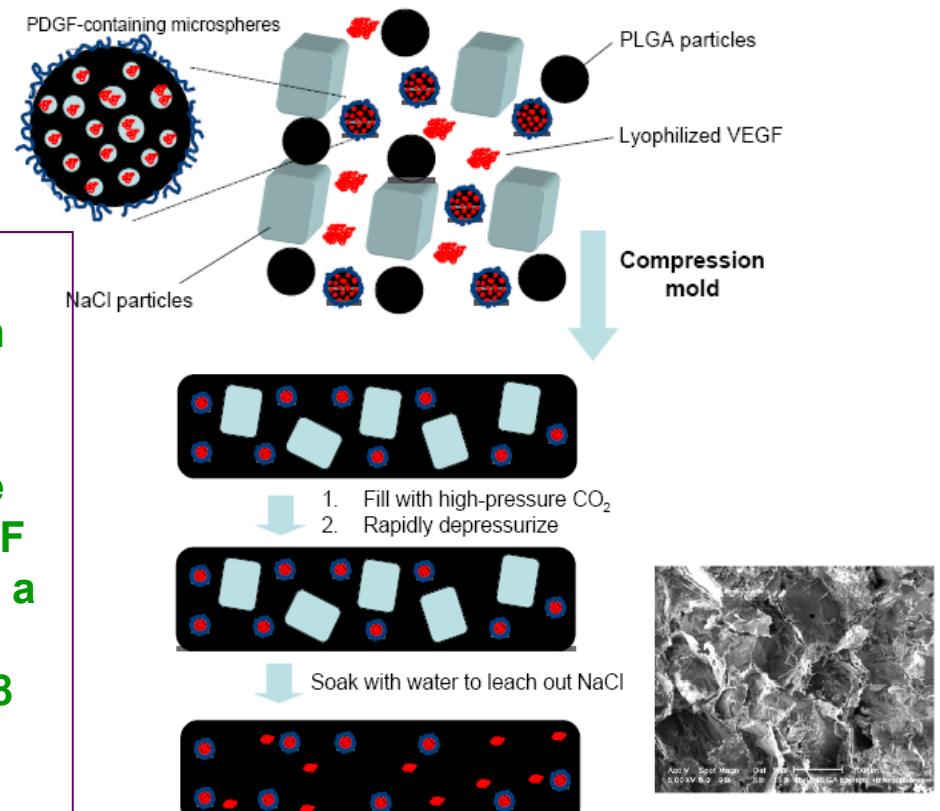
Rilascio di fattori di crescita (GF) da scaffold

Induzione della vascolarizzazione negli scaffold

- Rilascio duale di GF da scaffold degradabili per la sintesi de novo di vasi sanguigni.

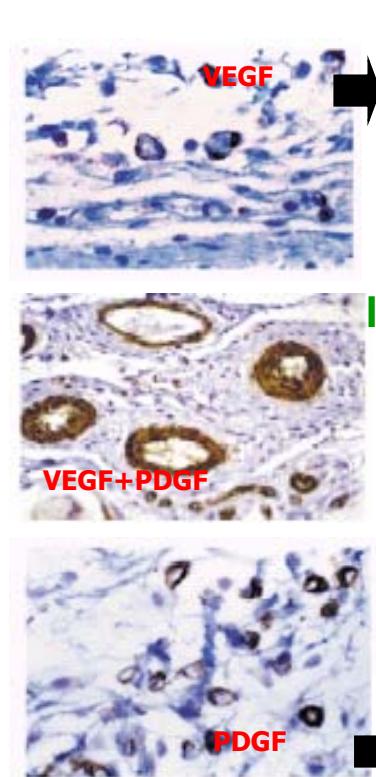
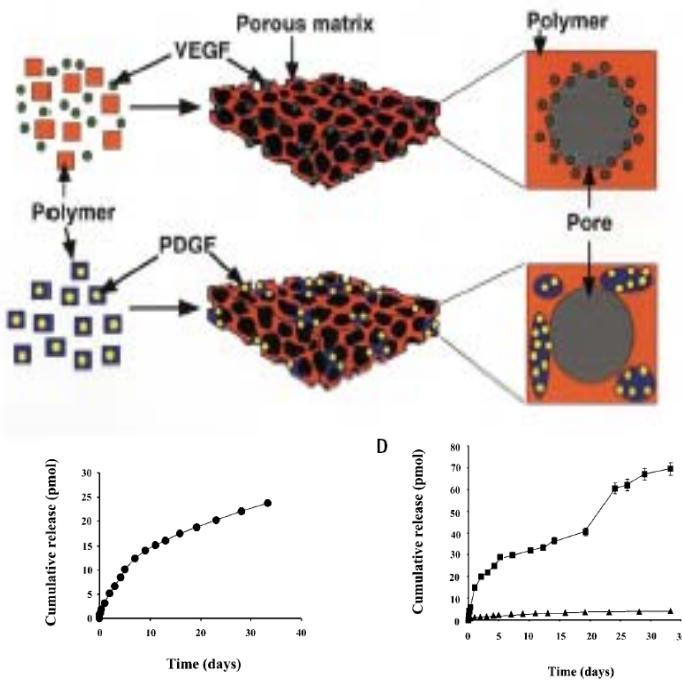
Processo di fabbricazione:

- PDGF encapsulato in microsfere di PLGA con approccio doppia emulsione
- Microsfere (5-50 micron) miscelate con particelle di PLGA (150-250 micron), particelle di NaCl (250-500 micron) e particelle con VEGF liofilizzato (5-50 micron) in stampo e stampati a compressione a formare un disco solido
- Il disco è equilibrato con CO₂ a 800 psi per 48 ore
- Pressione è rapidamente abbassata a 14 psi
- Sali lisciviati da una immersione in acqua distillata per 48 ore



Rilascio di fattori di crescita (GF) da scaffold

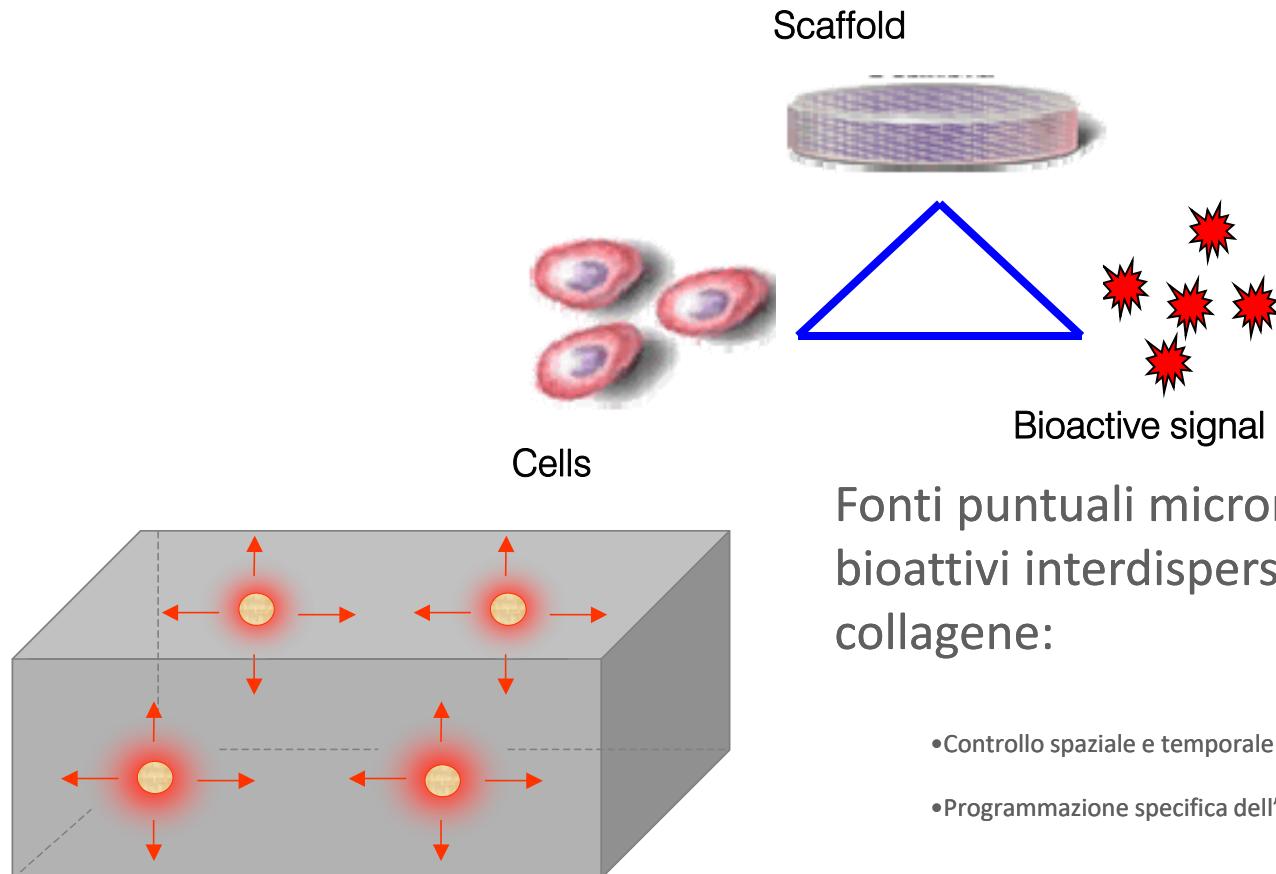
Il rilascio sequenziale di VEGF e PDGF-BB utilizzando un dispositivo polimerico a rilascio controllato per via sottocutanea in un modello animale di ischemia induce la maturazione di una nuova rete vascolare con i vasi che hanno uno spesso strato di cellule muscolari lisce.



L'infiltrazione di cellule endoteliali nel costrutto ha richiesto più di due settimane in questo modello, che può limitare la dimensione di tali costrutti tessutali

Richardson et al., Nature 2001

Codifica cronoprogrammata di segnali biologici in matrici 3D



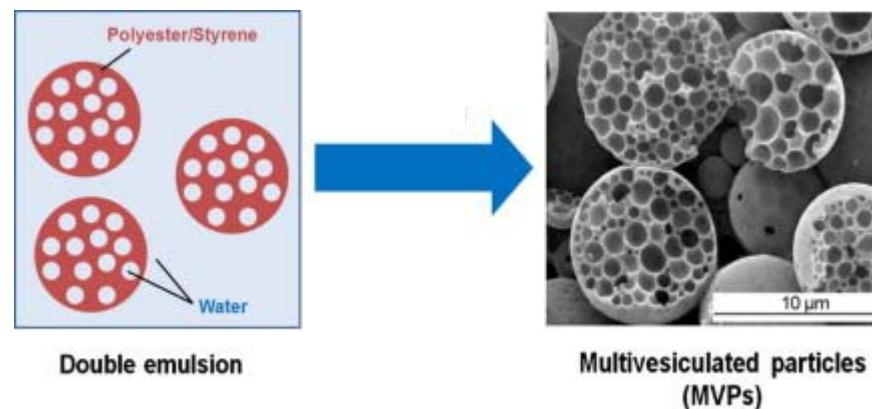
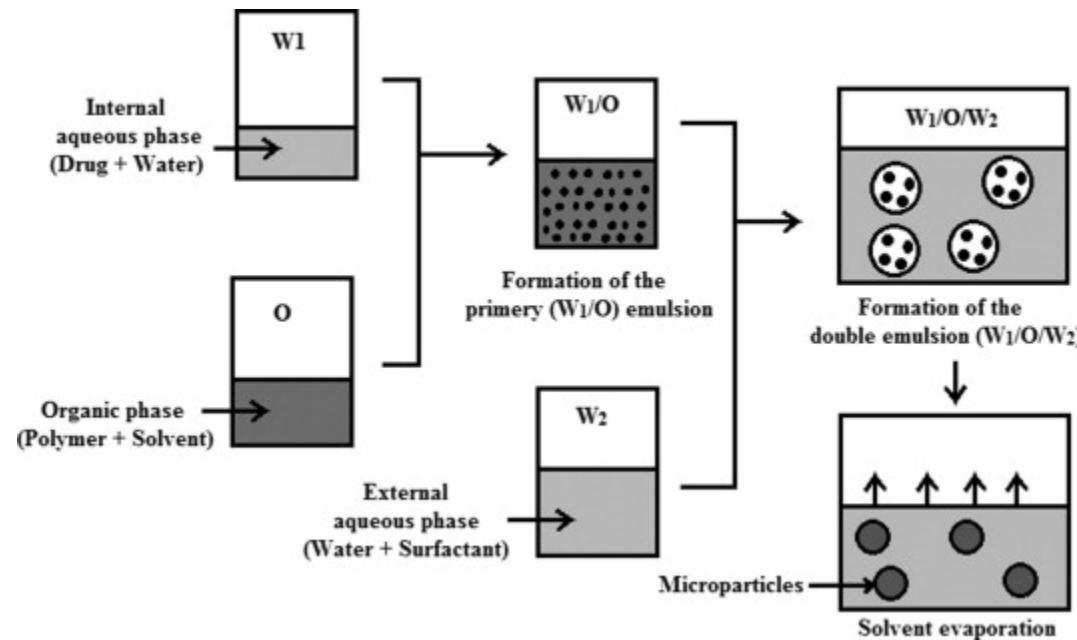
Microcarrier di PLGA caricati con l'agente

Fonti puntuali micrometriche di agenti bioattivi interdispersi in scaffold 3D di collagene:

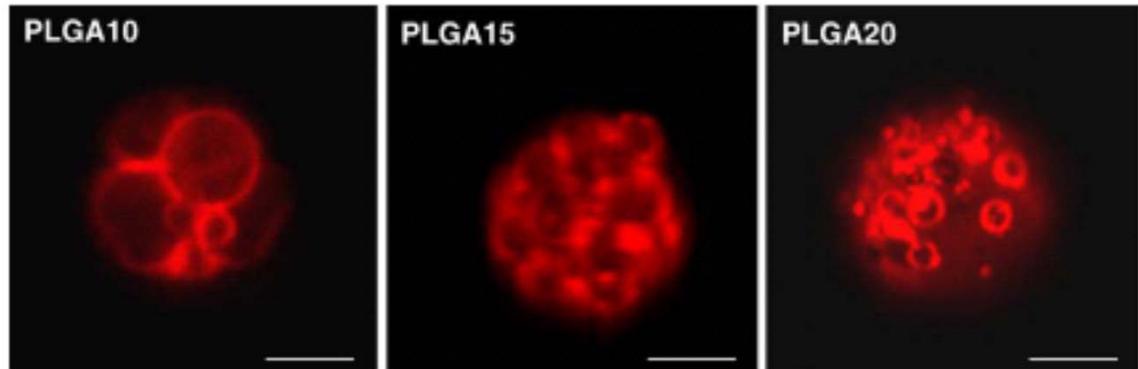
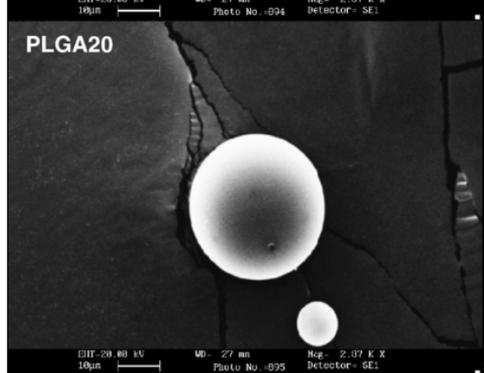
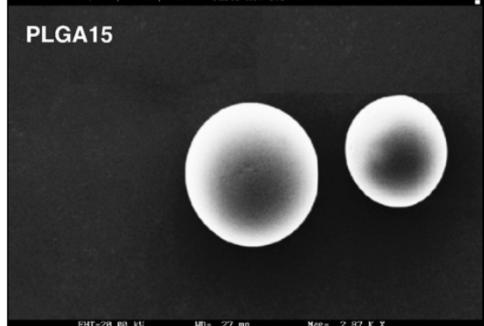
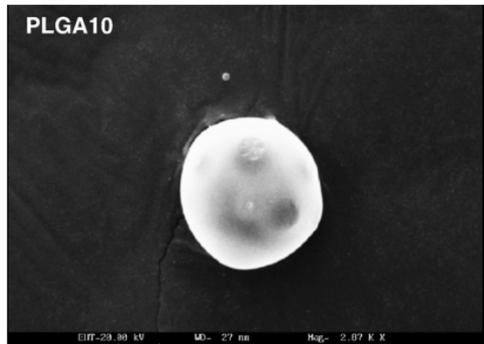
- Controllo spaziale e temporale della distribuzione delle molecole bioattive
- Programmazione specifica dell'attività cellulare

F. Ungaro, et al., J Contr Rel, 2006

Microcarrier per fattori bioattivi



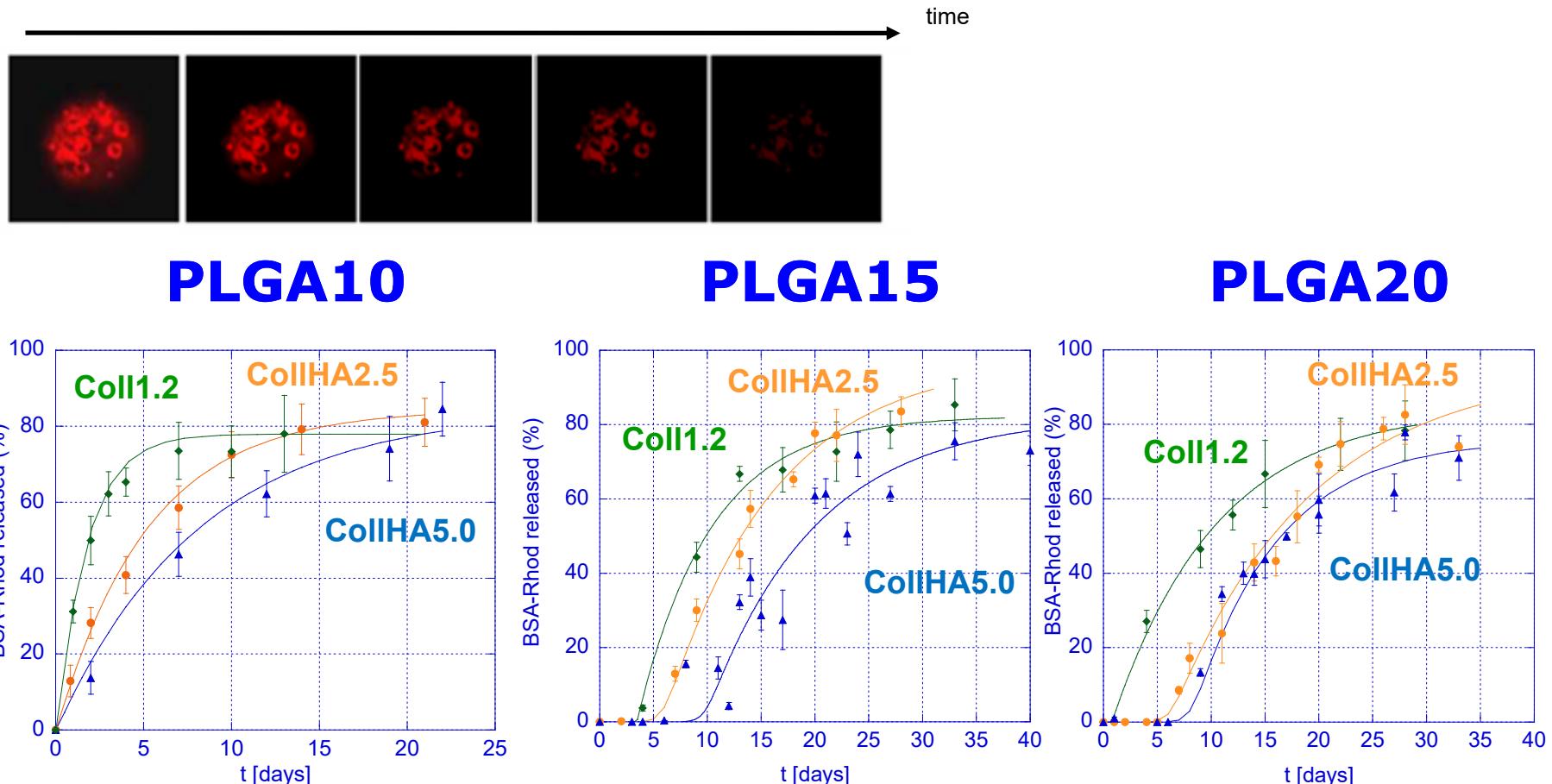
Microcarrier per fattori bioattivi



- Velocità di degradazione e di rilascio modulabile
- Efficienza di caricamento elevata e modulabile

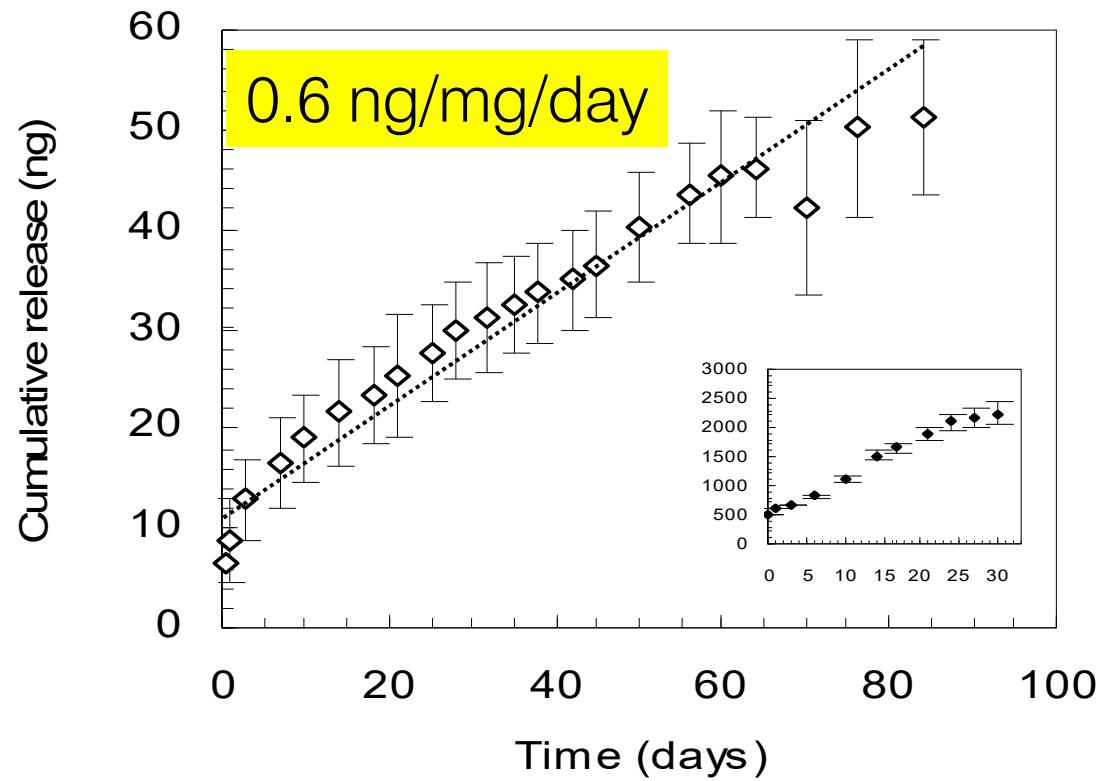
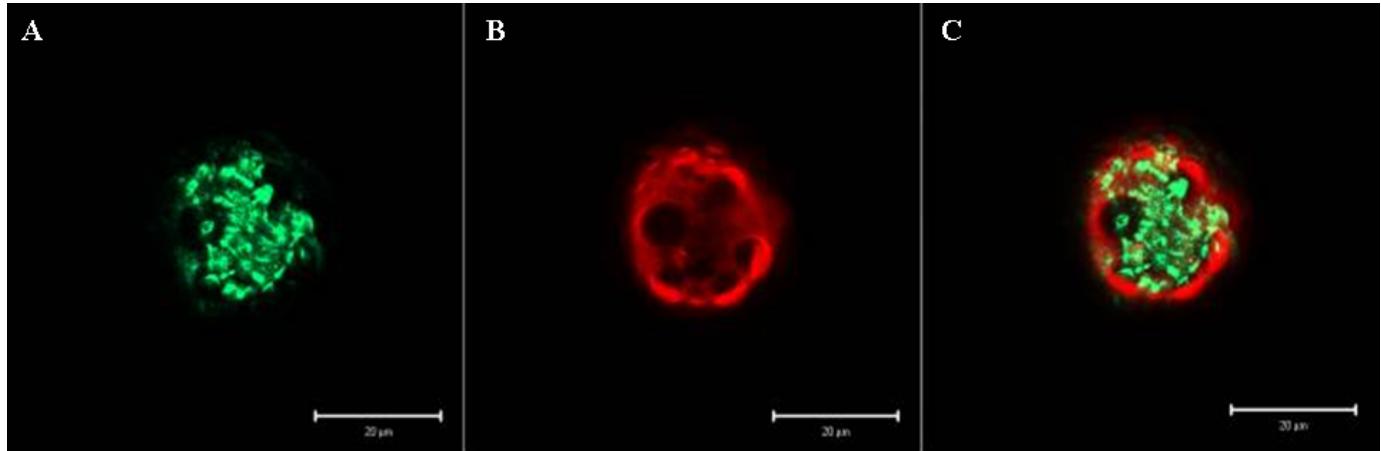
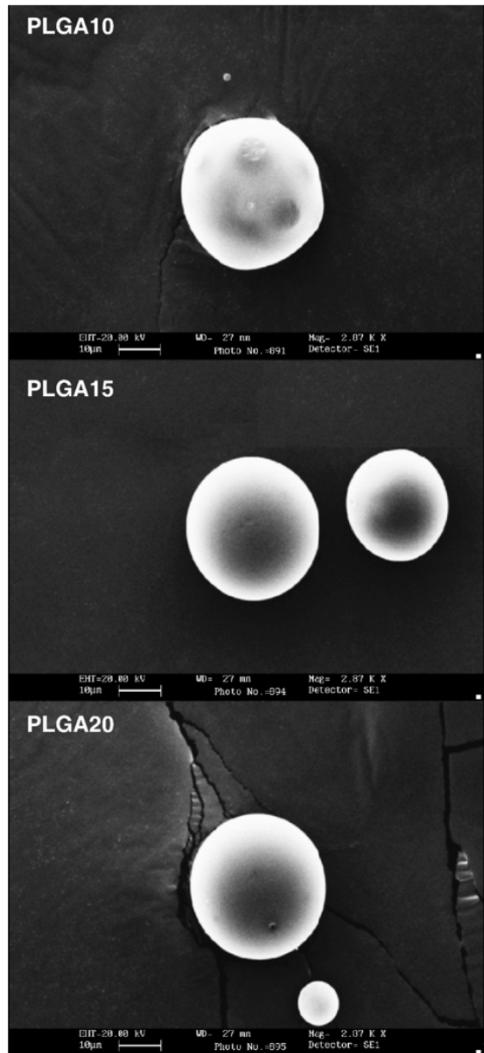
Formulation	Mean diameter ($\mu\text{m} \pm \text{SD}$)
PLGA10	23.0 ± 0.9
PLGA15	22.1 ± 1.5
PLGA20	20.0 ± 1.3

Cinetiche di rilascio

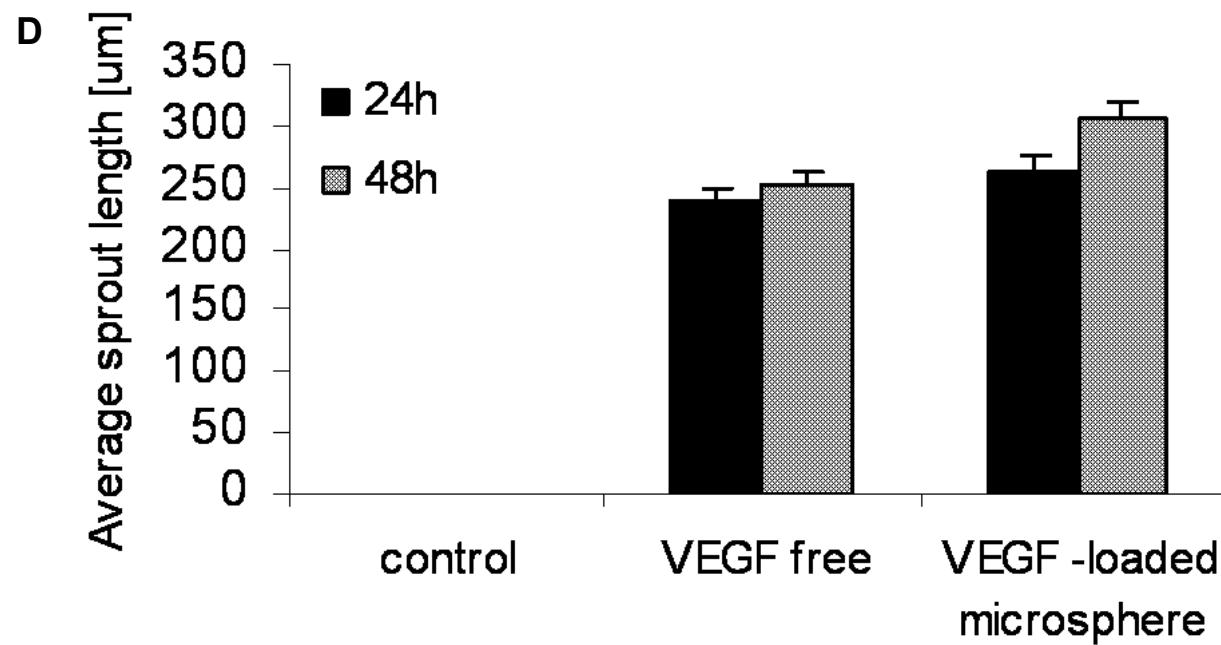
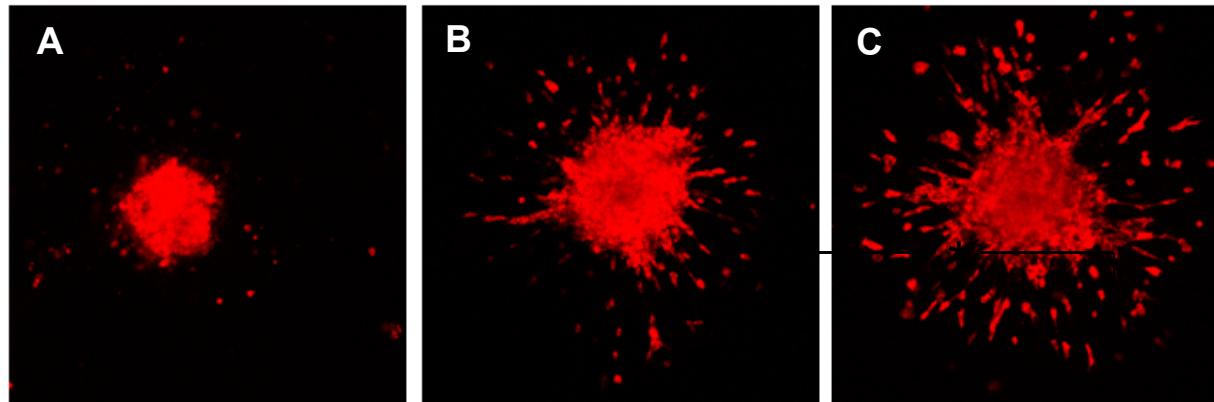


- ✓ Il rilascio della proteina dipende dalla natura idrofila dello scaffold e può essere modulata dalla formulazione di microsfere

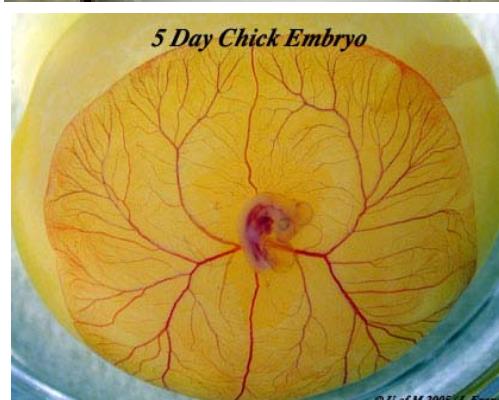
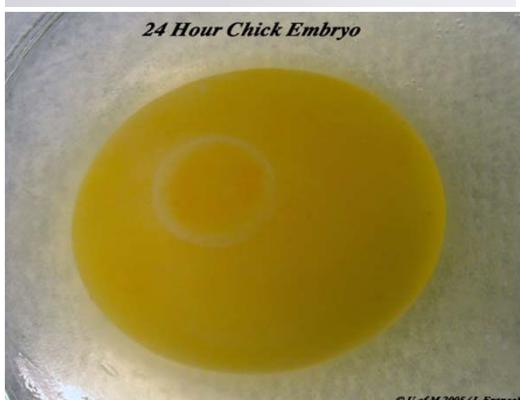
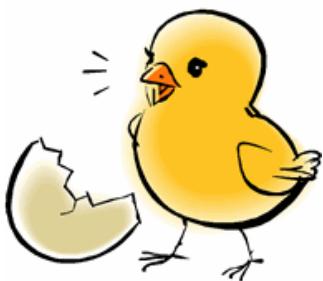
Microcarrier caricati con VEGF



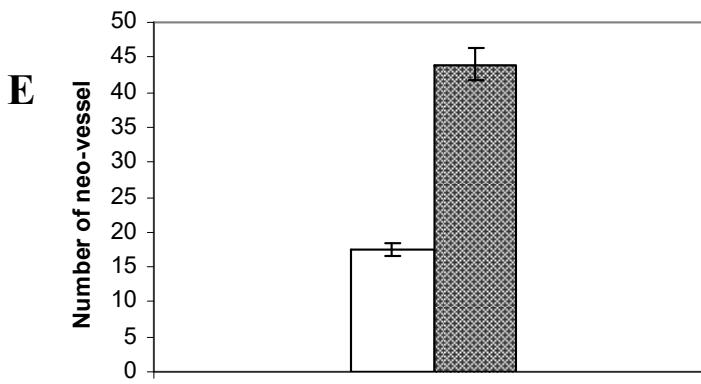
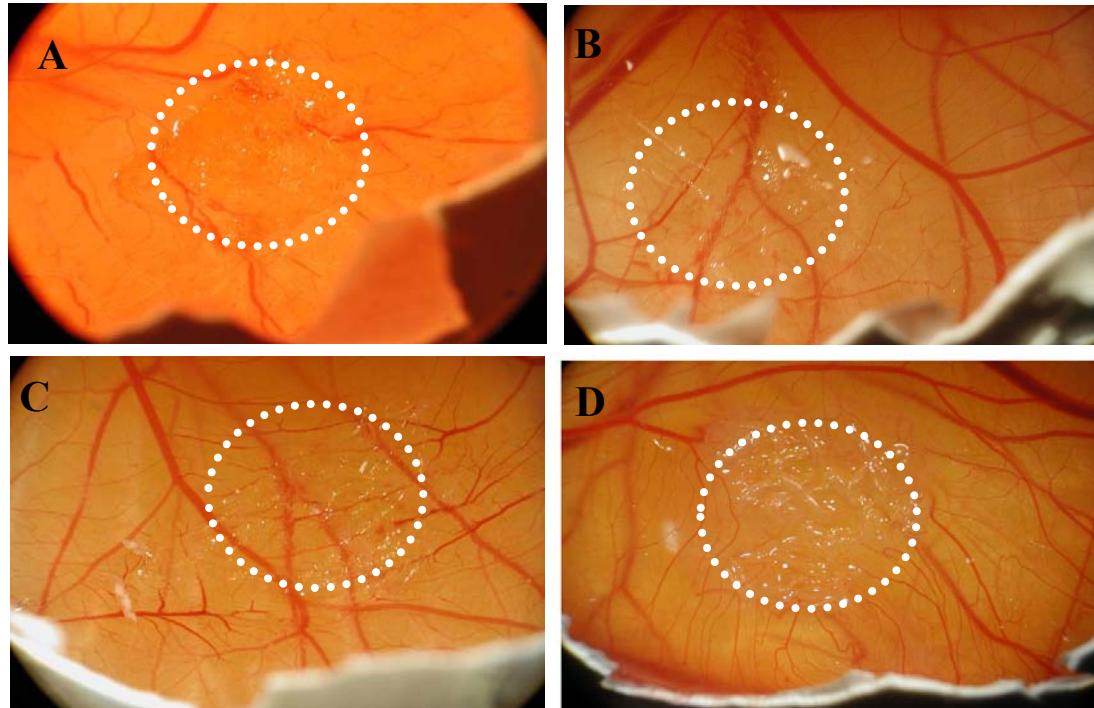
Scaffold di collagene attivati con VEGF



Saggio CAM



Risultati saggio CAM

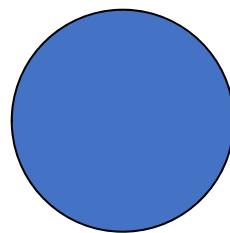


Borselli et al, JBMR, 2010

Scaffold multifunzionali bioattivati

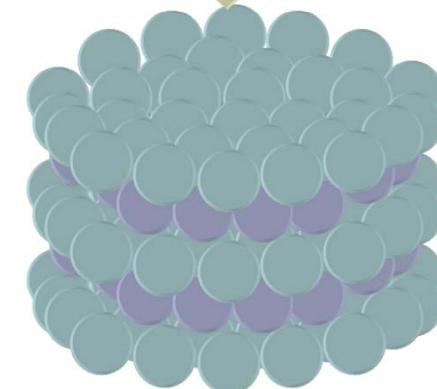
EMULSIONE SINGOLA

Preparazione di microsfere porose e non attraverso l'utilizzo di polimori solubili (W/O) o non solubili (O/W) in acqua.



Preparazione delle microparticelle

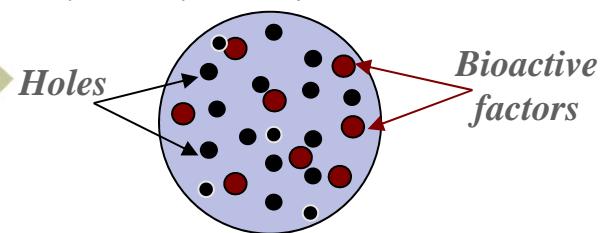
Sinterizzazione/ Stampaggio



Progettazione di una "toolbox" per preparare scaffold con porosità definita, grado di interconnessione, proprietà meccaniche e distribuzione temporale e spaziale di bioagenti

DOPPIA EMULSIONE

Preparazione di microsfere porose, caricate con fattori bioattivi utilizzando polimeri solubili (W/O/W) o non solubili (O/W/O) in acqua.



CASD/CASM

Luciani et al, Biomaterials, 2008

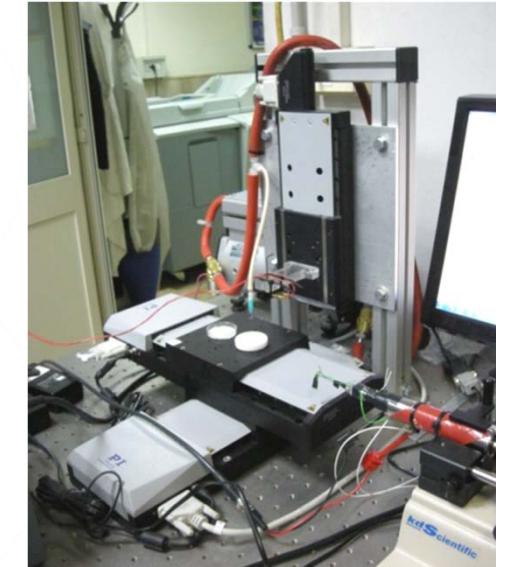
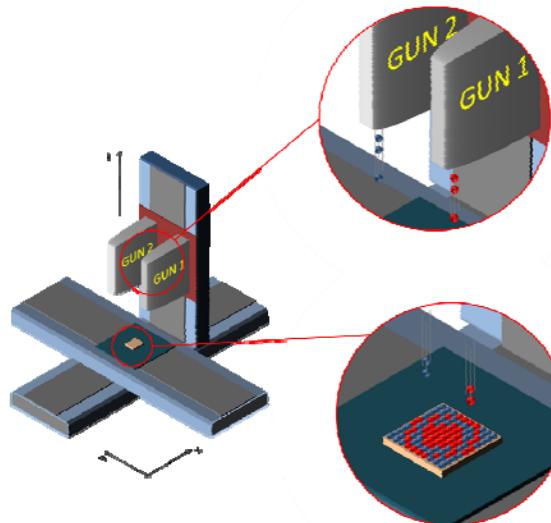
Scaffold multifunzionali bioattivati

CASM

- Input: CASD model file
- Output: 3D scaffold built layer-by-layer

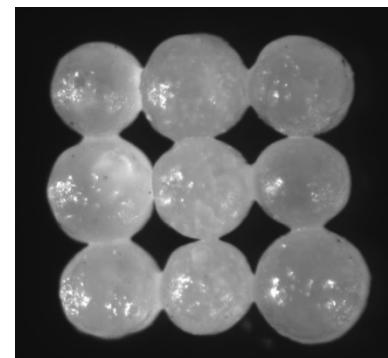
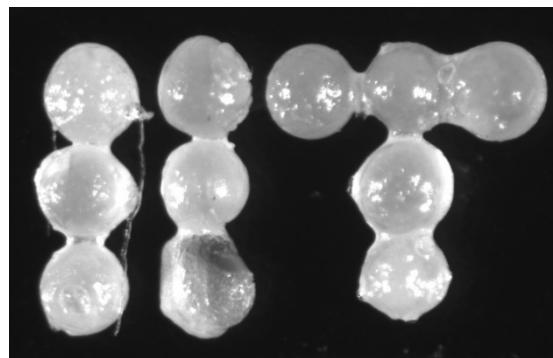
Specifications

- Porosity
- Density
- Single μ -particle position

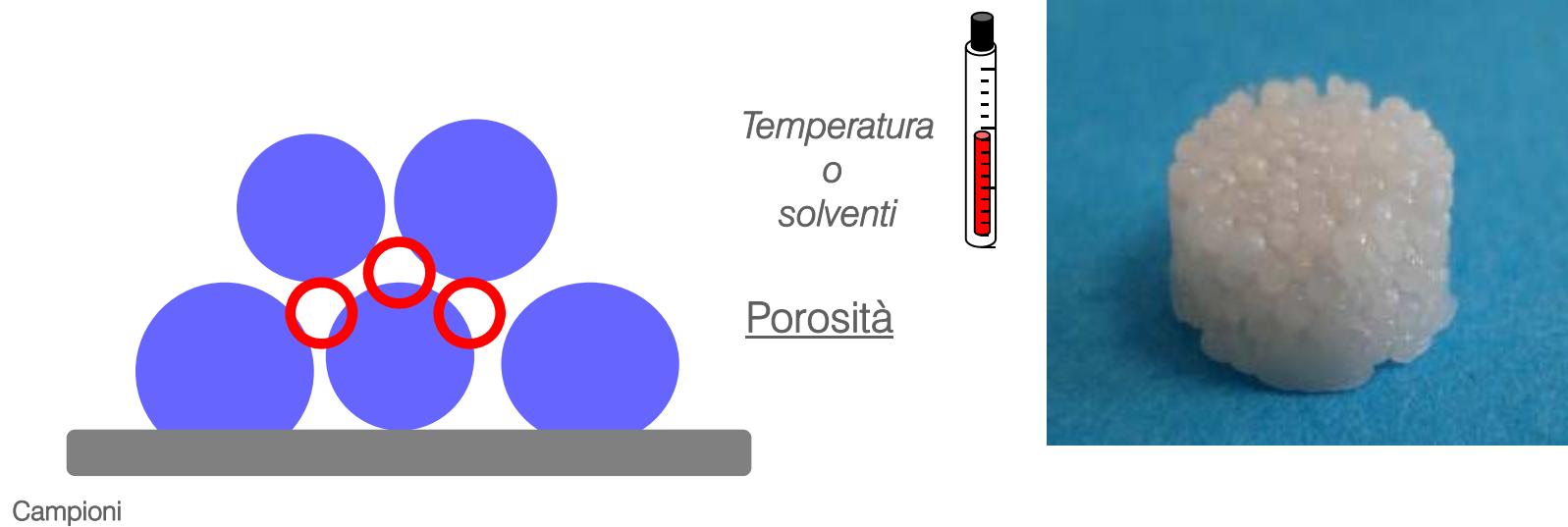


Elements

- Micro-particles with different chem./mech. features

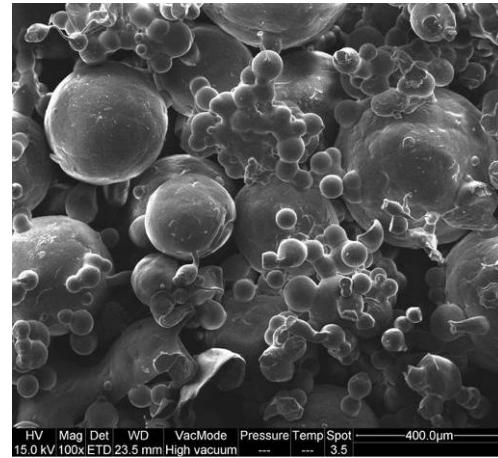
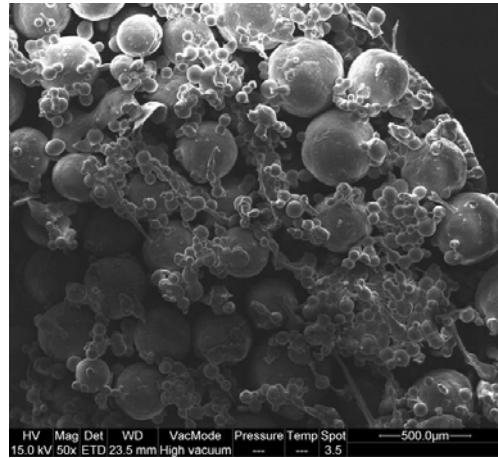


Scaffold multifunzionali bioattivati

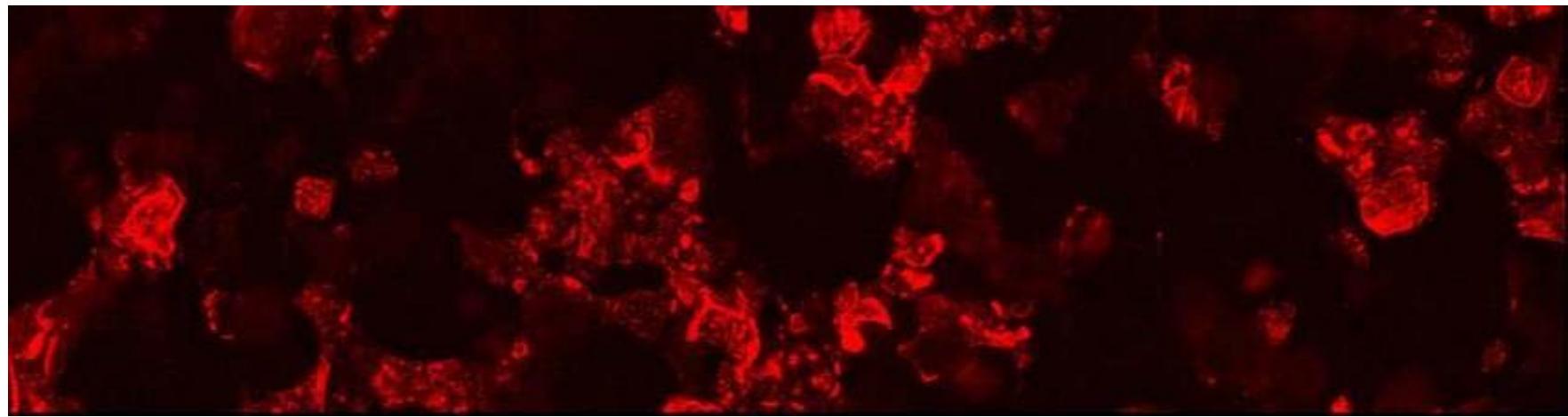


Matrici senza fattore bioattivo	Protein-free microspheres Protein-free microspheres	500 ÷ 630 µm 300 ÷ 500 µm
Matrici cariche con fattori bioattivi	Protein-free microspheres (300 ÷ 500 µm)	+ Protein-loaded microspheres (50 ÷ 180 µm)

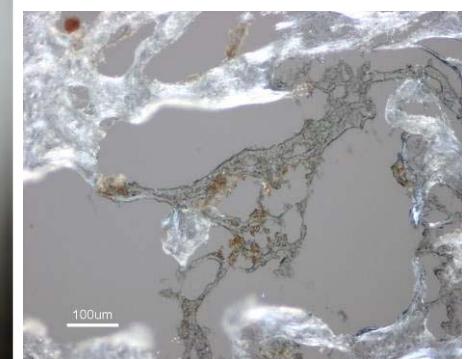
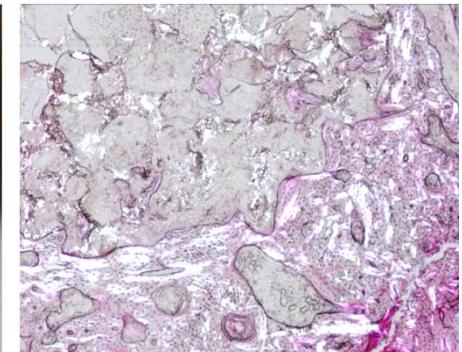
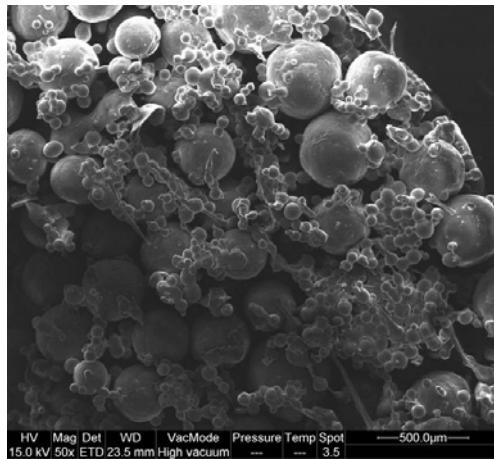
Morfologia e distribuzione agente bioattivo



Distribuzione agente bioattivo



Formazione di tessuto osseo in vivo



Raggi X 60 gg dopo l'impianto

Savarino et al., *Biomaterials* 2008

Presentation of bioactive signals in 3D

Recruitment of MSC by 3D matrices bioactivated with BMP-2 gradients

