

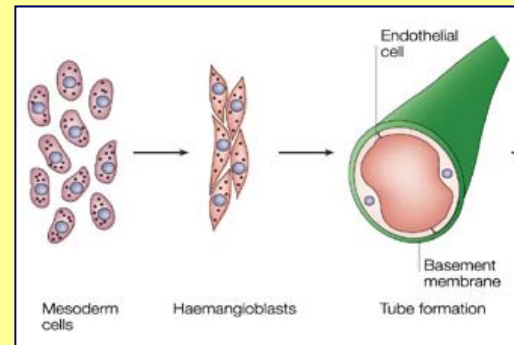
Vascularizzazione di Scaffold

Ingegneria dei Tessuti

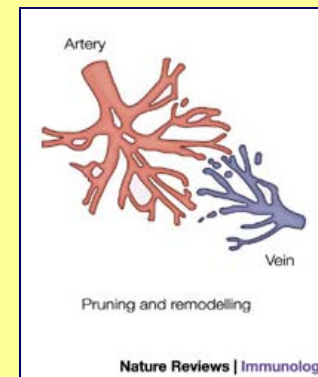
31/10/017

In vivo

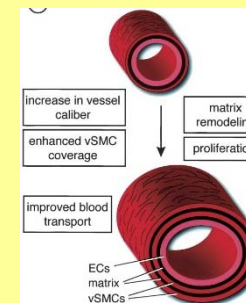
1. Vasculogenesis



2. Angiogenesis

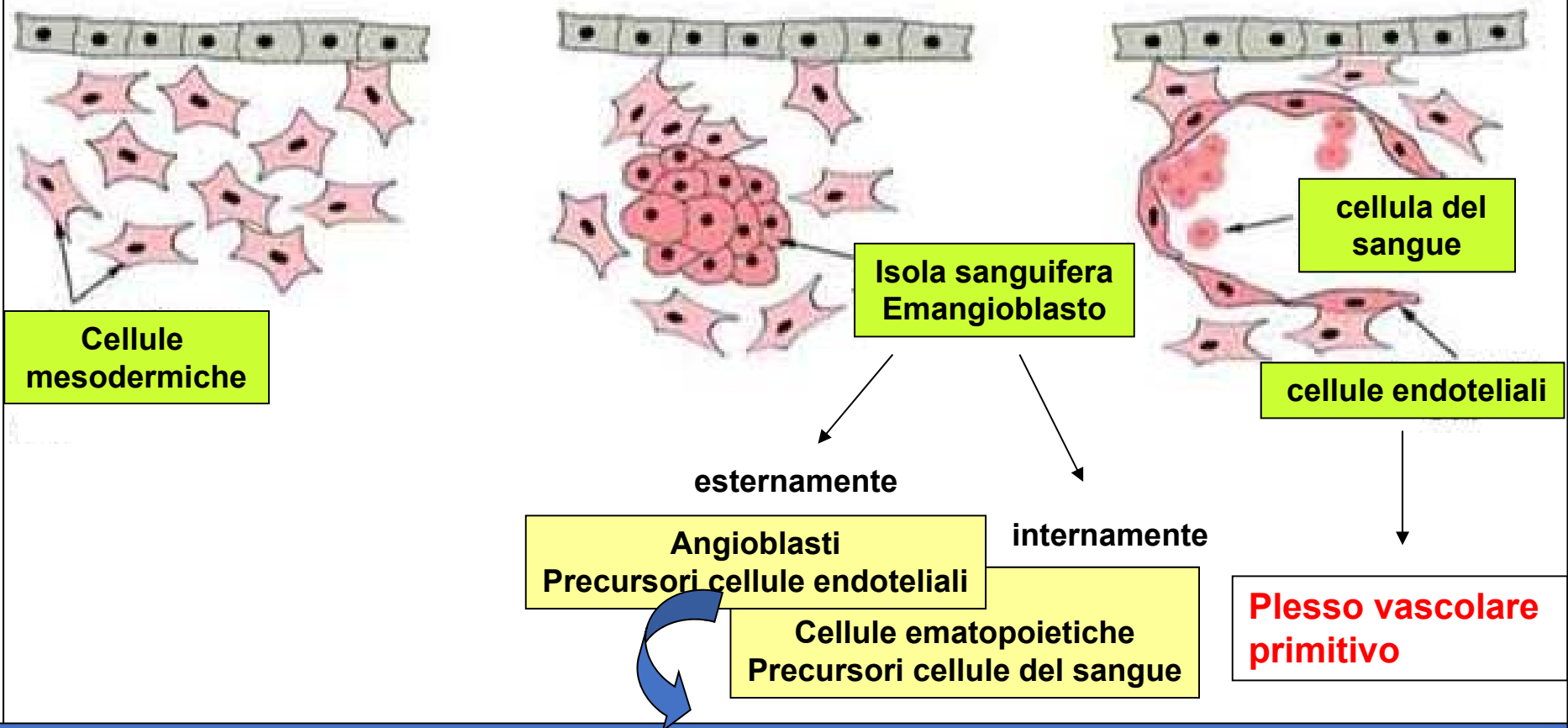


3. Arteriogenesis



VASCULOGENESI

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

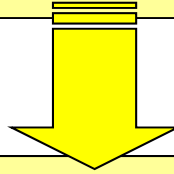


Esse sono definite come cellule che hanno la potenzialità di differenziare in cellule endoteliali ma non hanno ancora markers specifici

PLASTICITÀ FENOTIPICA delle CELLULE ENDOTELIALI

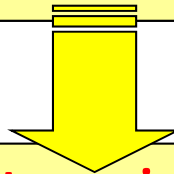
Stato quiescente vs Stato angiogenico

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



L'endotelio nell'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

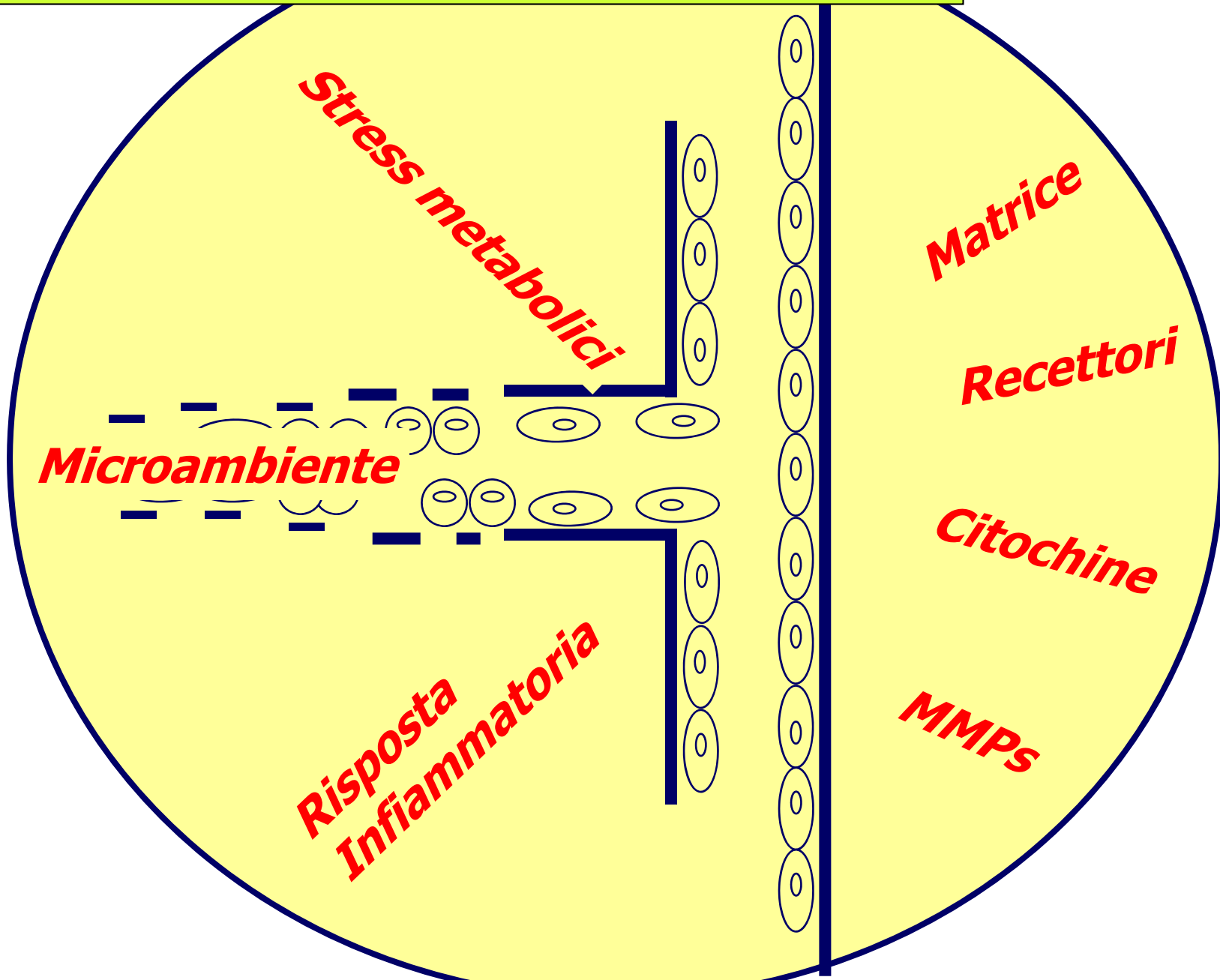


L'endotelio si dice essere in uno **stato angiogenico** per il rapido turnover cellulare

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	+	+
α_v integrin	+	+

Condizioni che attivano l'angiogenesi...



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

1. Stimolazione delle cellule endoteliali da parte di fattori con attività angiogenica

2. Degradazione della lamina basale dei capillari da parte delle cellule endoteliali attivate ad opera di proteasi extracellulari.

Fattori
Angiogenici

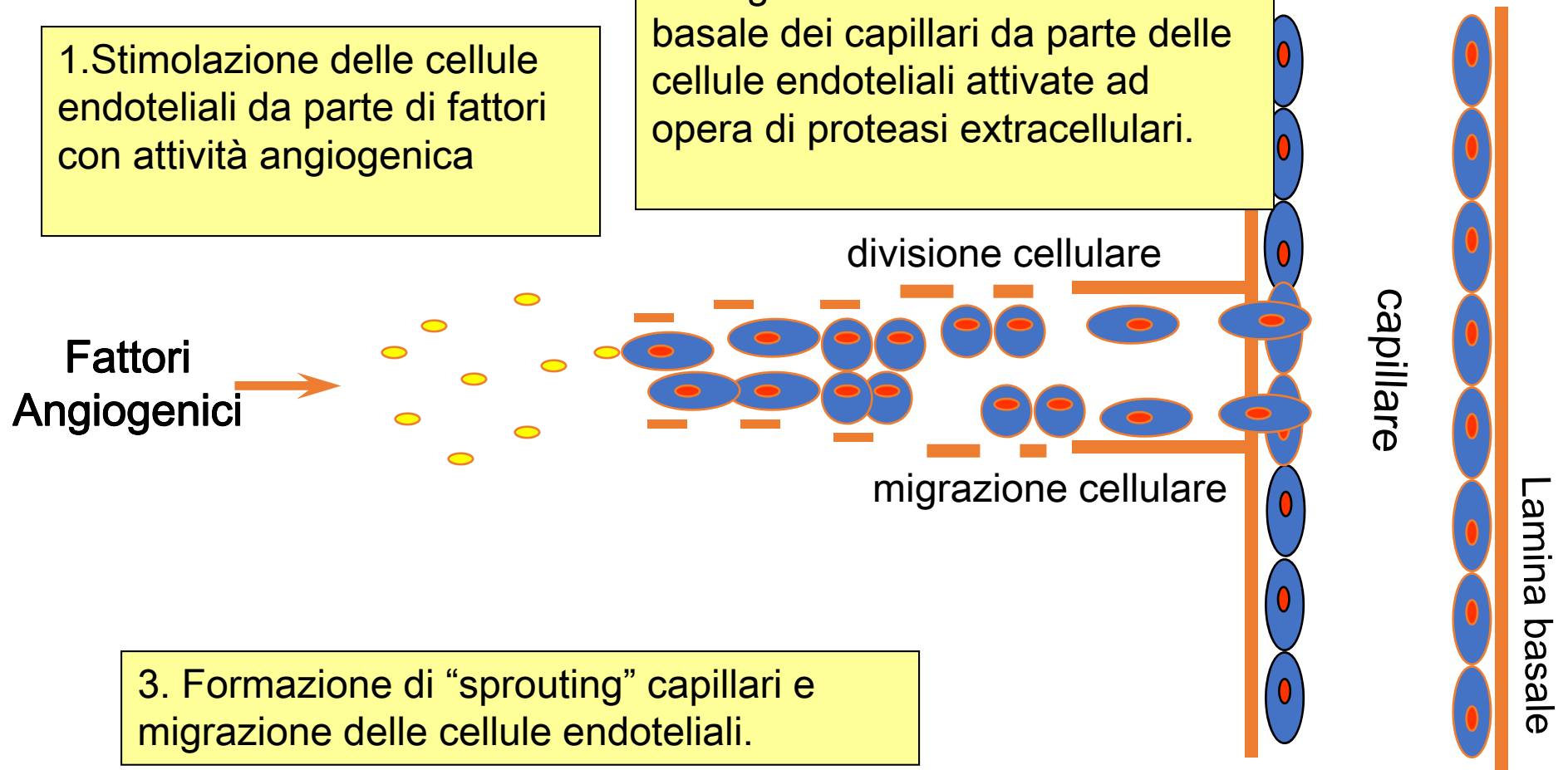
divisione cellulare

migrazione cellulare

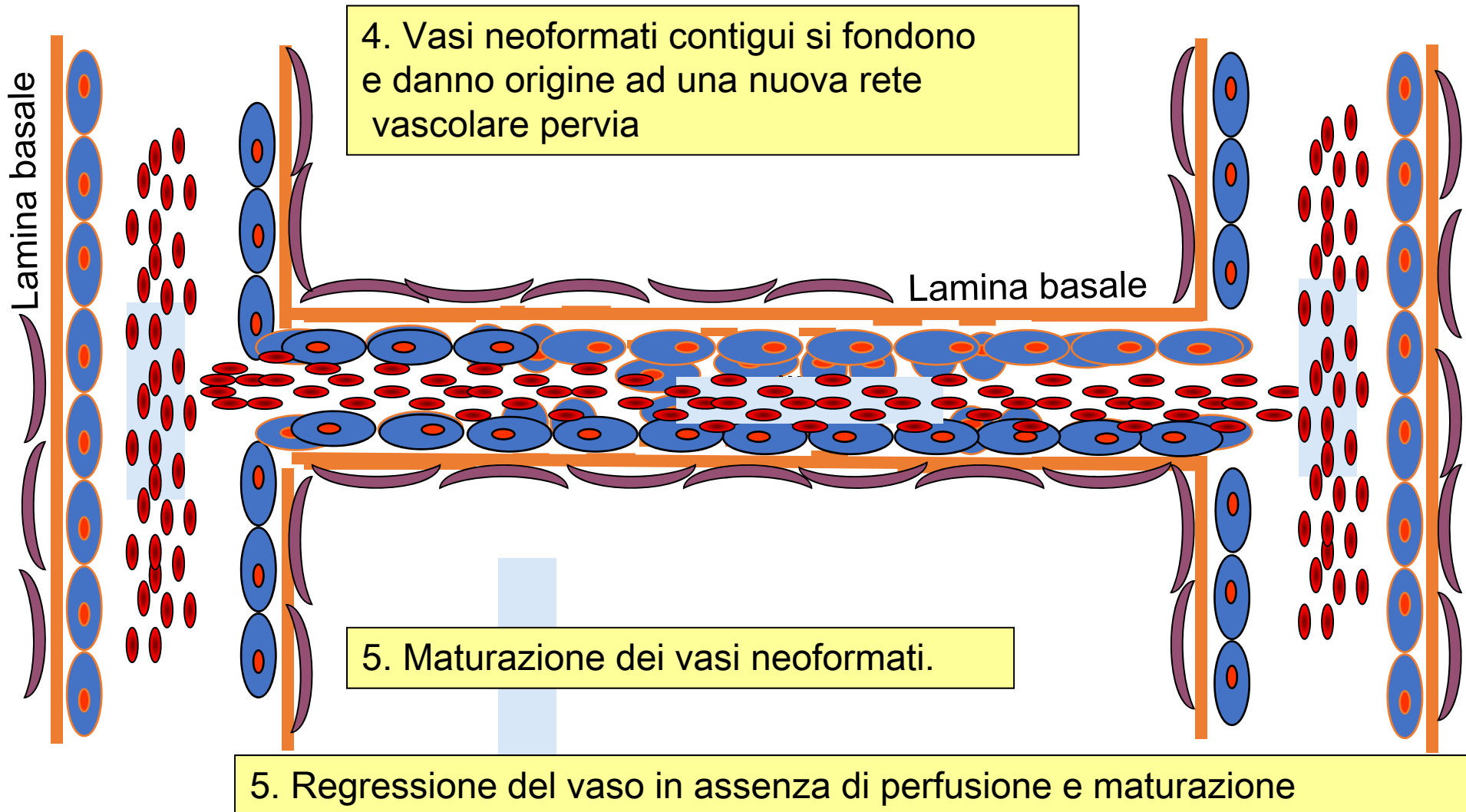
capillare

Lamina basale

3. Formazione di “sprouting” capillari e migrazione delle cellule endoteliali.



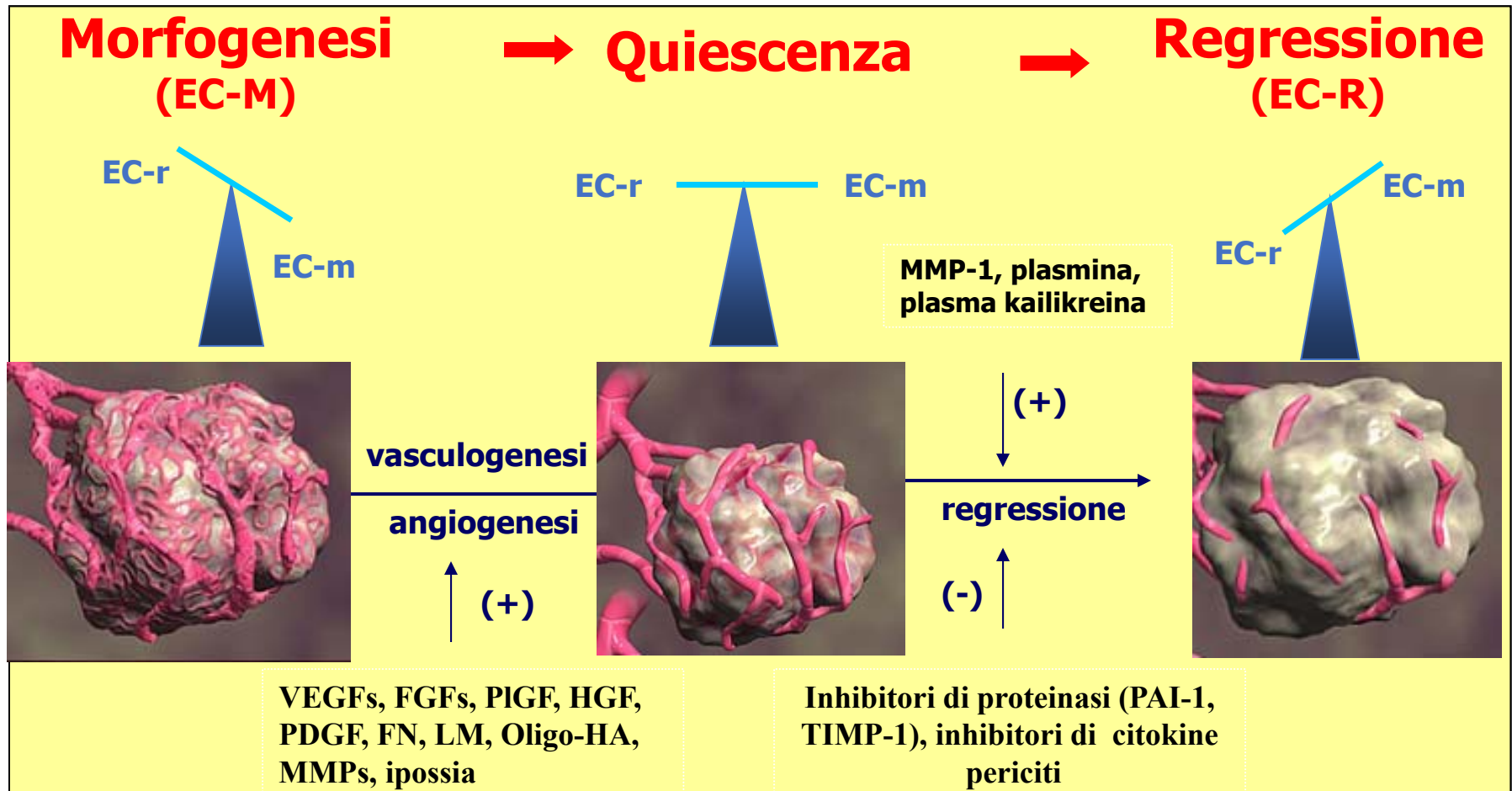
“Sprouting” angiogenico: un processo “multi-step”



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

Passaggio da stato quiescente a stato angiogenico

1

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

2

Modificazione della lamina basale subendoteliale

3

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

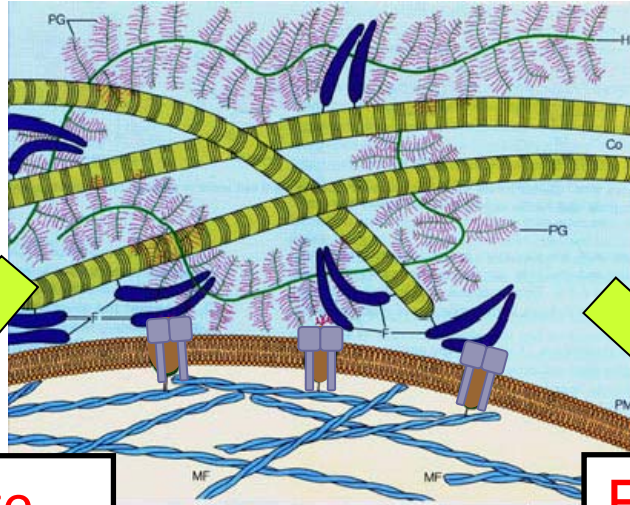
PlGF

Fattore di crescita placentale

PDGF

Angiogenina

Modificazione della LAMINA BASALE subendoteliale



Endotelio quiescente

Endotelio angiogenico

**Collagene IV
Laminina
HA**

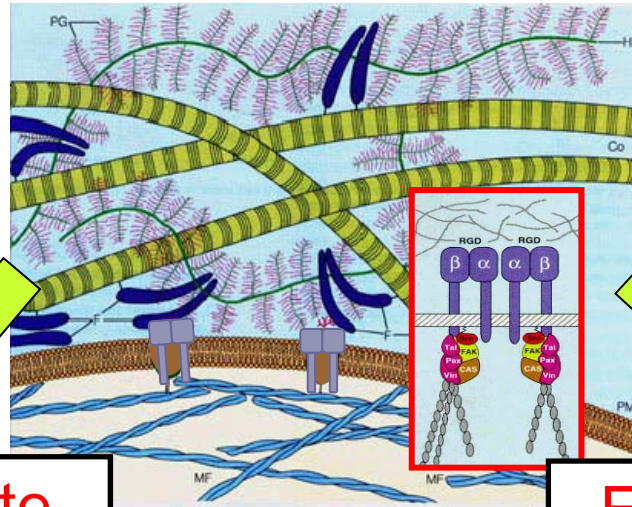
degradazione



rimodellamento

**Fibronettina, vitronettina,
Oligo-HA, Fibrina, Collagene
I, VIII, matricellular protein
(SPARC, TSP-1)**

Modificazione dell'espressione delle INTEGRINE



Endotelio quiescente

$\alpha_2\beta_1$, $\alpha_1\beta_1$
 $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$

Collagene,
laminina

ECM Quiescente

← *Disponibilità dei ligandi* →

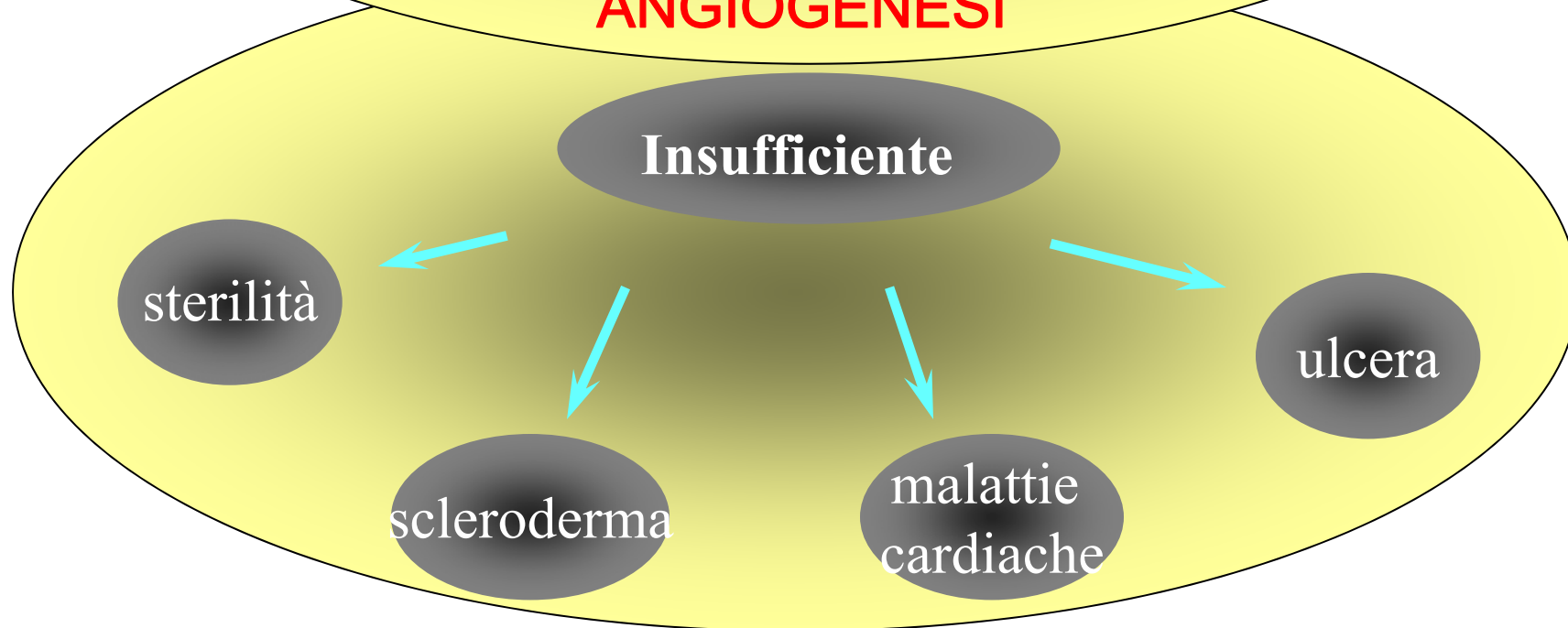
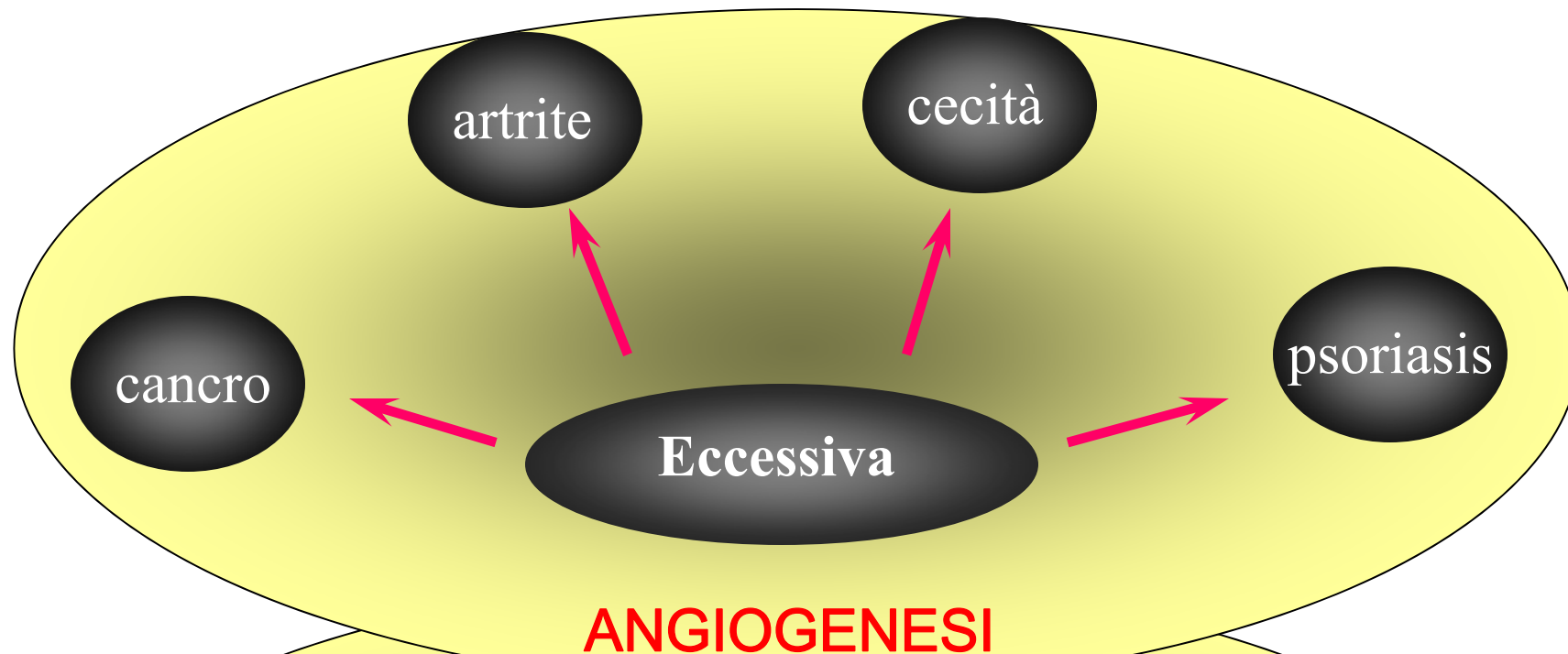
ECM Angiogenica

Endotelio angiogenico

$\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_2\beta_1$
 \downarrow $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$

Fibronectina,
laminina

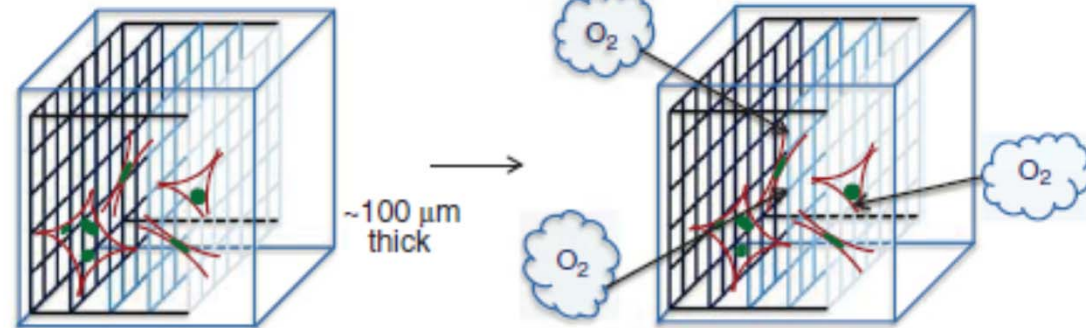
Integrin	Expression on ECs		Ligand availability	
	Quiescent	Angiogenic	Basal ECM	Provisional ECM
$\alpha_1\beta_1$	++	++	+++	+
$\alpha_2\beta_1$	++	++	++	++
$\alpha_3\beta_1$	+	+	++	++
$\alpha_5\beta_1$	++	+++	+	+++
$\alpha_6\beta_1$	++	++	++	+
$\alpha_6\beta_4$	+	+	++	+
$\alpha_v\beta_3$	-	+++	N/A	++++
$\alpha_v\beta_5$	+	+	+/-	+++



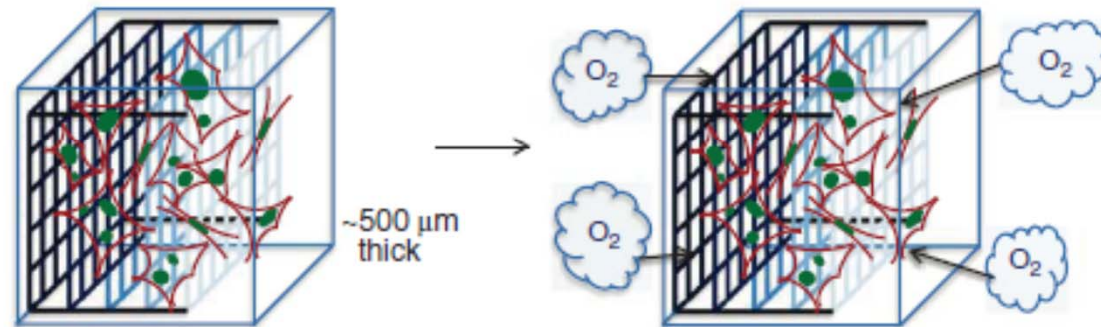
Vascularizzazione in ingegneria dei tessuti

Vascularizzazione di matrici polimeriche

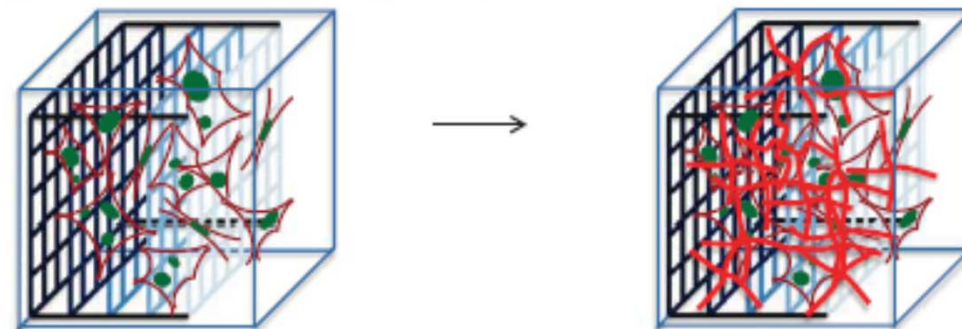
(a) Early stages of tissue formation



(b) Tissue growth and development



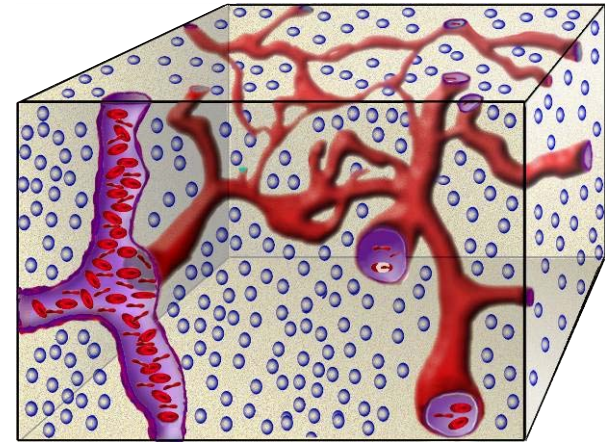
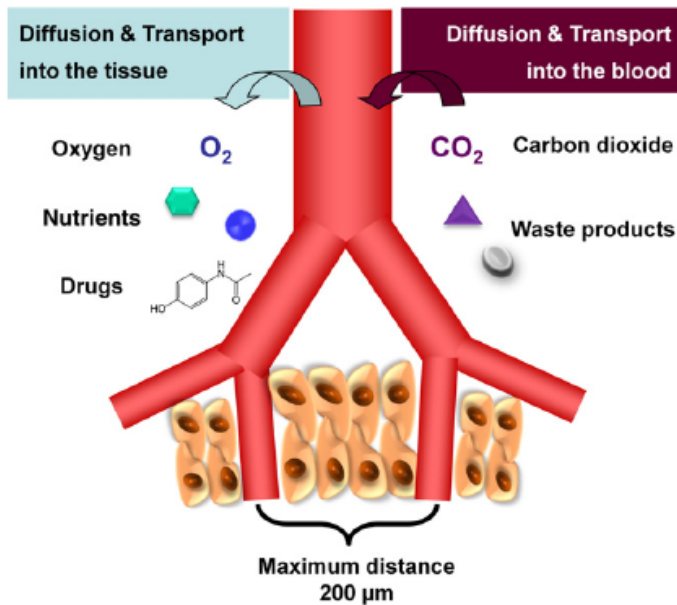
(c) Vascularization for tissue engineering



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 tissutale

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

Vascularizzazione 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

Implantation: time = 0



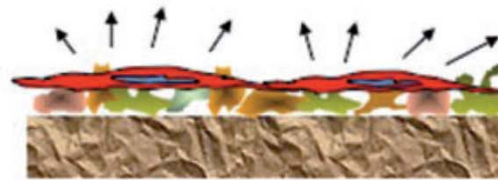
Protein-coated biomaterial

time = seconds



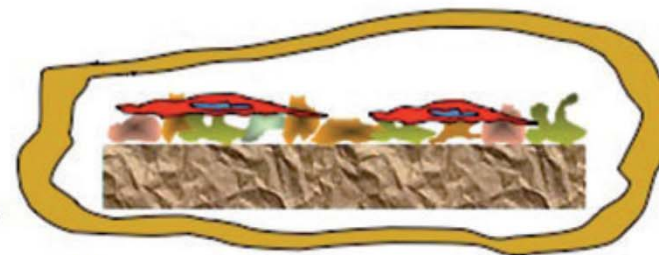
time = 48 hrs

Macrophage attack



time = 5 days

Frustrated phagocytosis



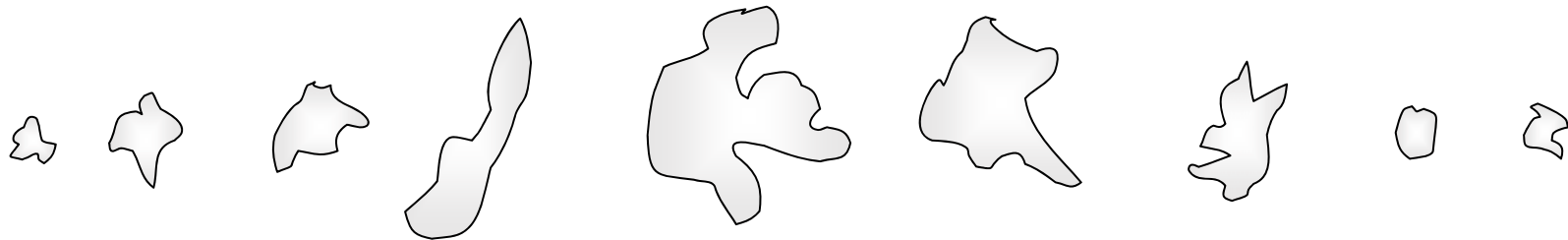
time = 2-3 weeks

Encapsulation

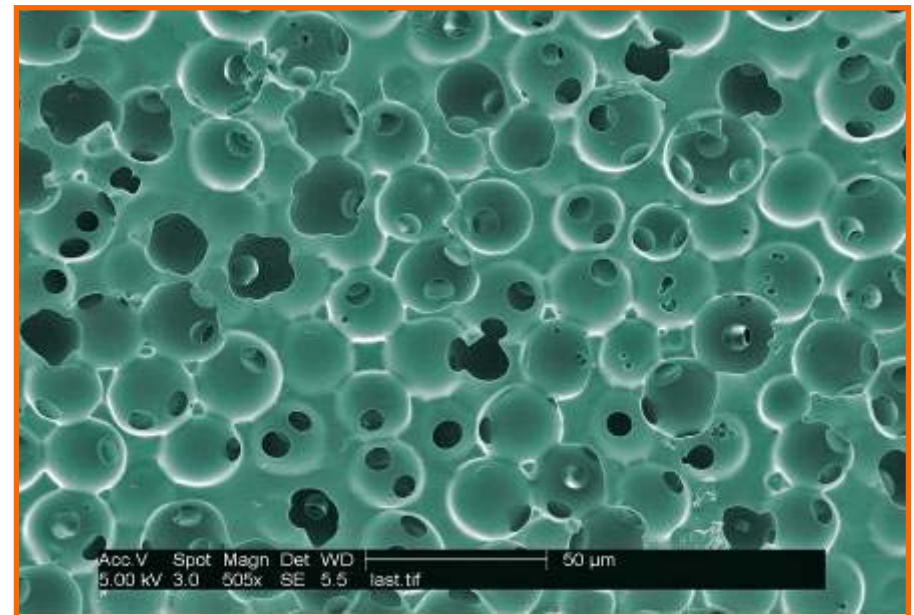
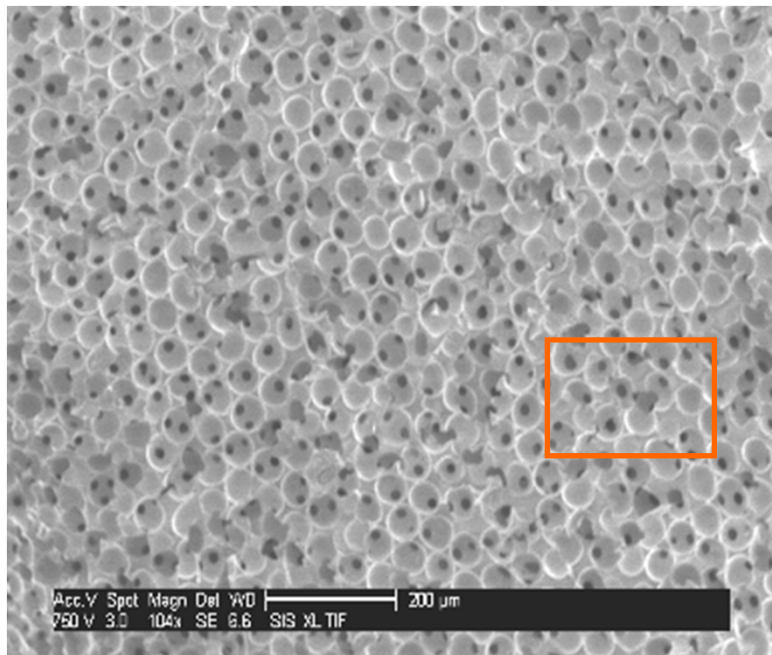
Ruolo della dimensione e della distribuzione dei pori nella vascolarizzazione di scaffold

Qual è la dimensione dei pori ottimale?

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



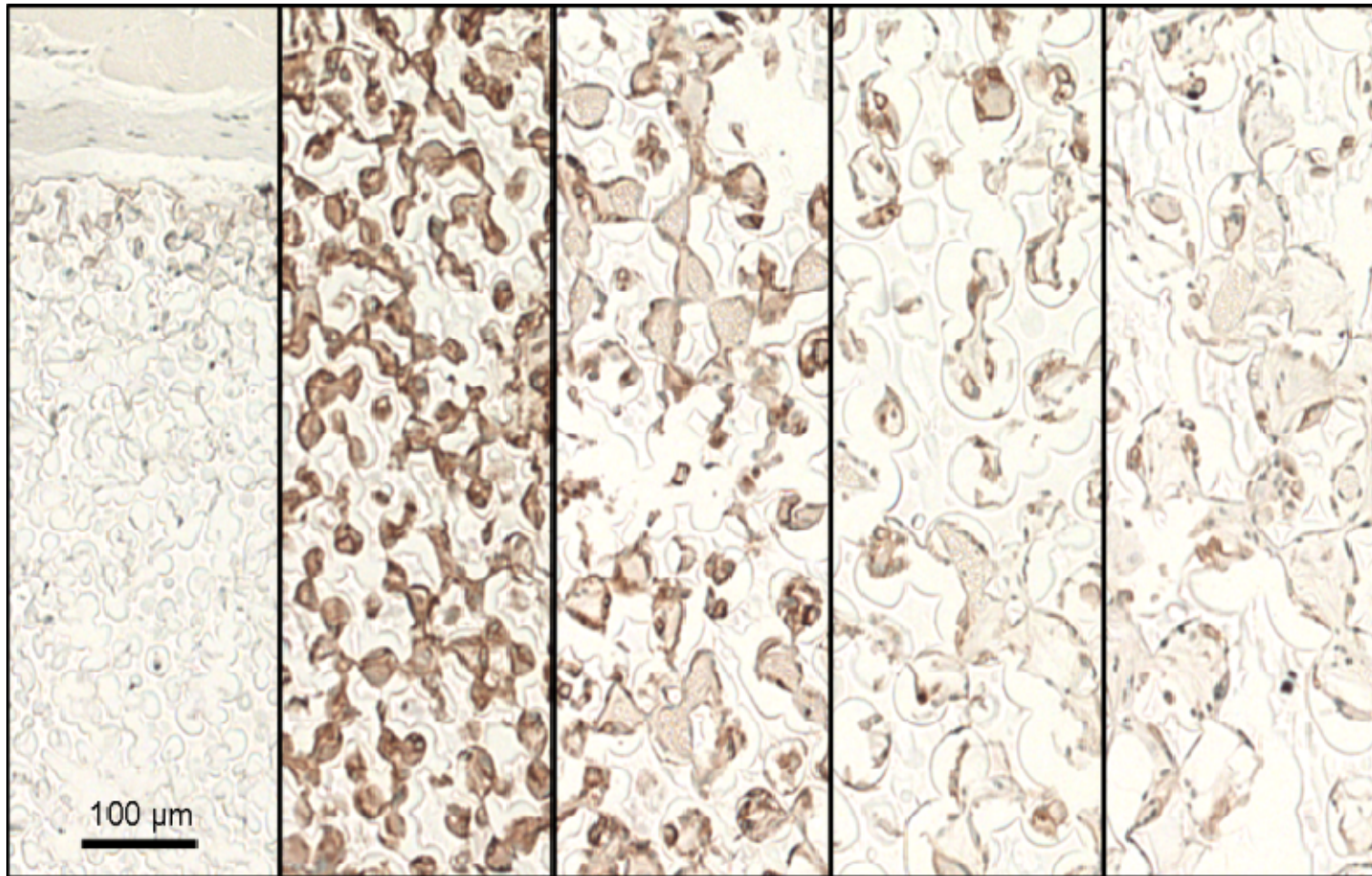
Scaffold 3D porosi con una stretta distribuzione della dimensione dei pori



Sphere-Templated Hydrogels

Marshall, AJ,

Dimensione dei pori e vascolarizzazione



20 μm

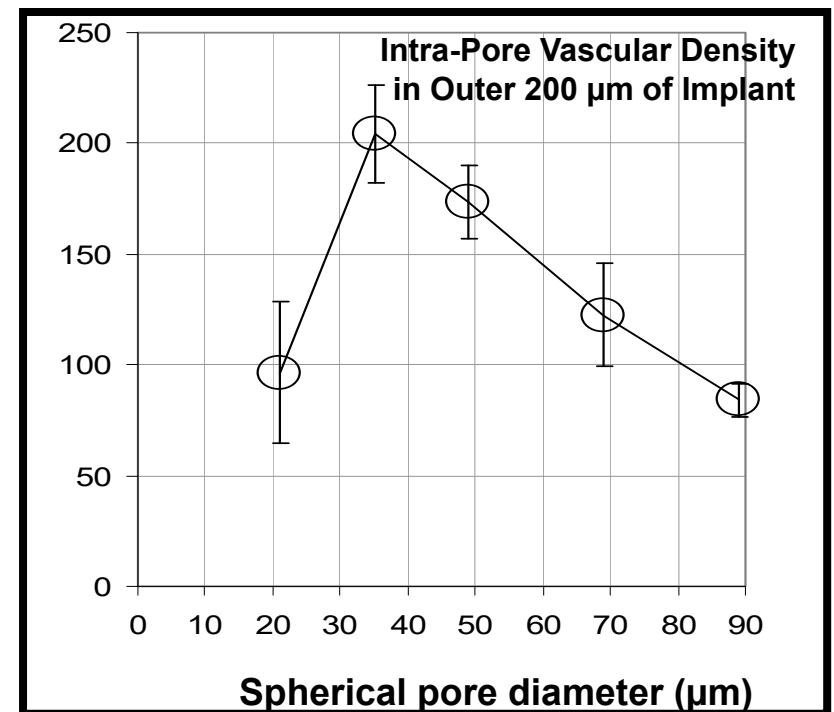
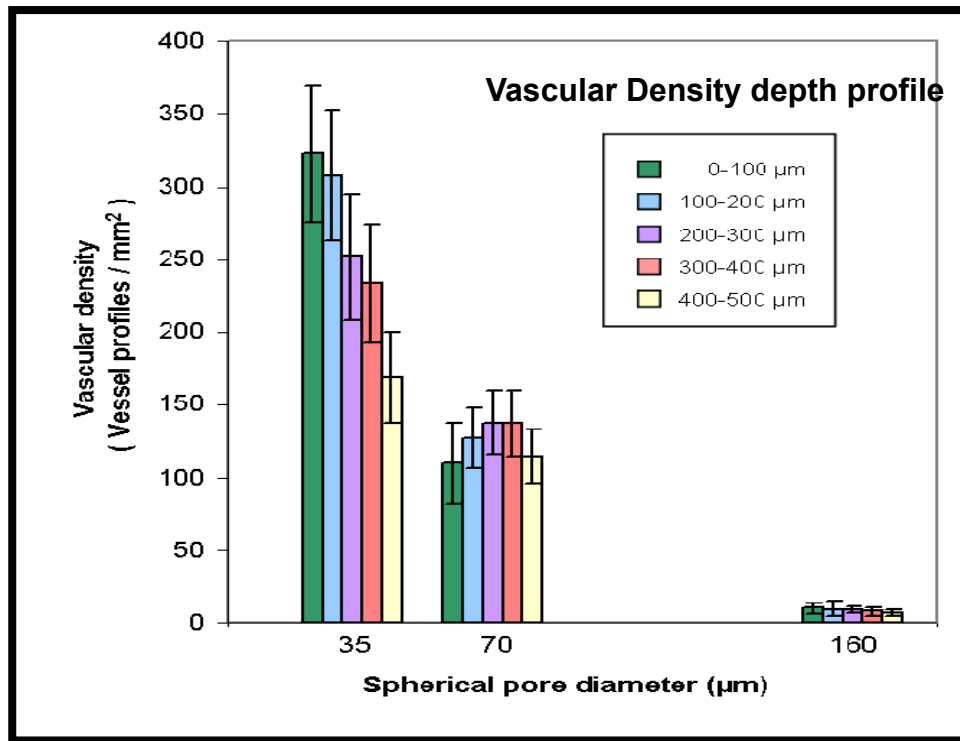
35 μm

50 μm

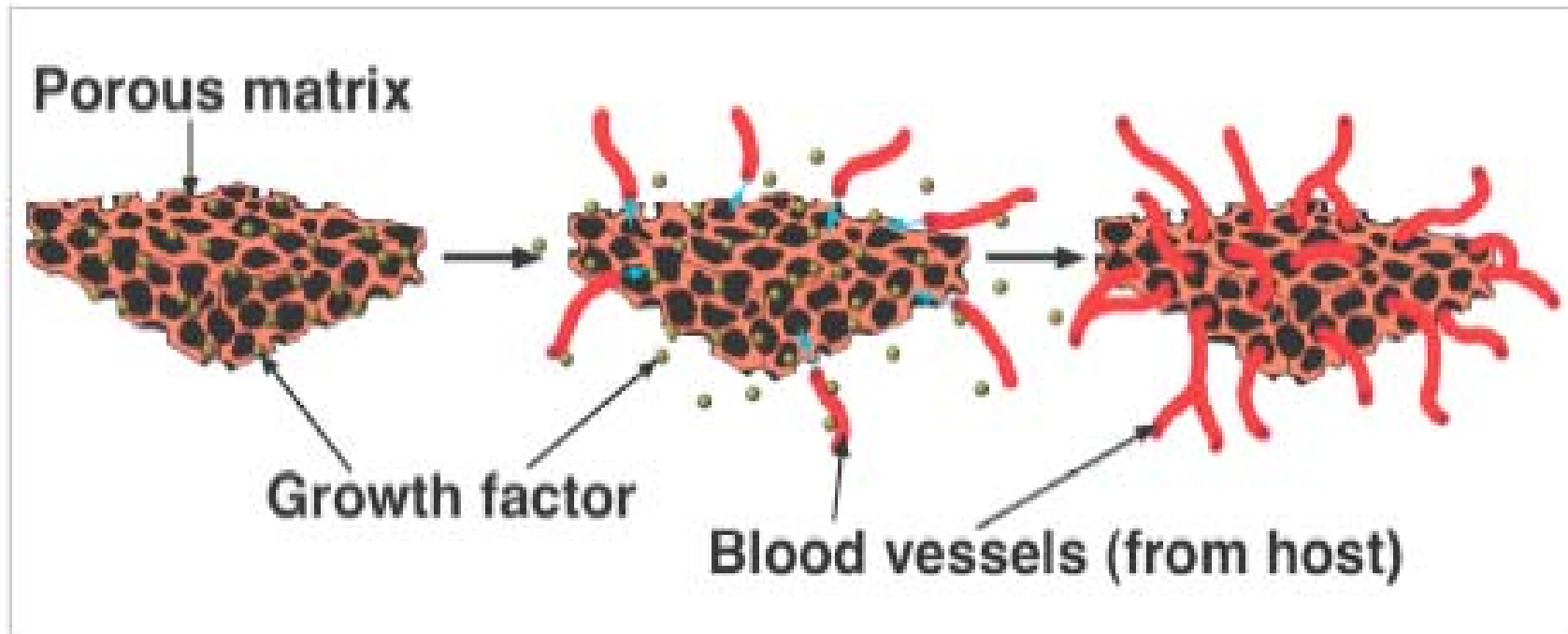
70 μm

90 μm

Dimensione dei pori e vascolarizzazione



Come si possono ottenere vasi sanguigni migliori?



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

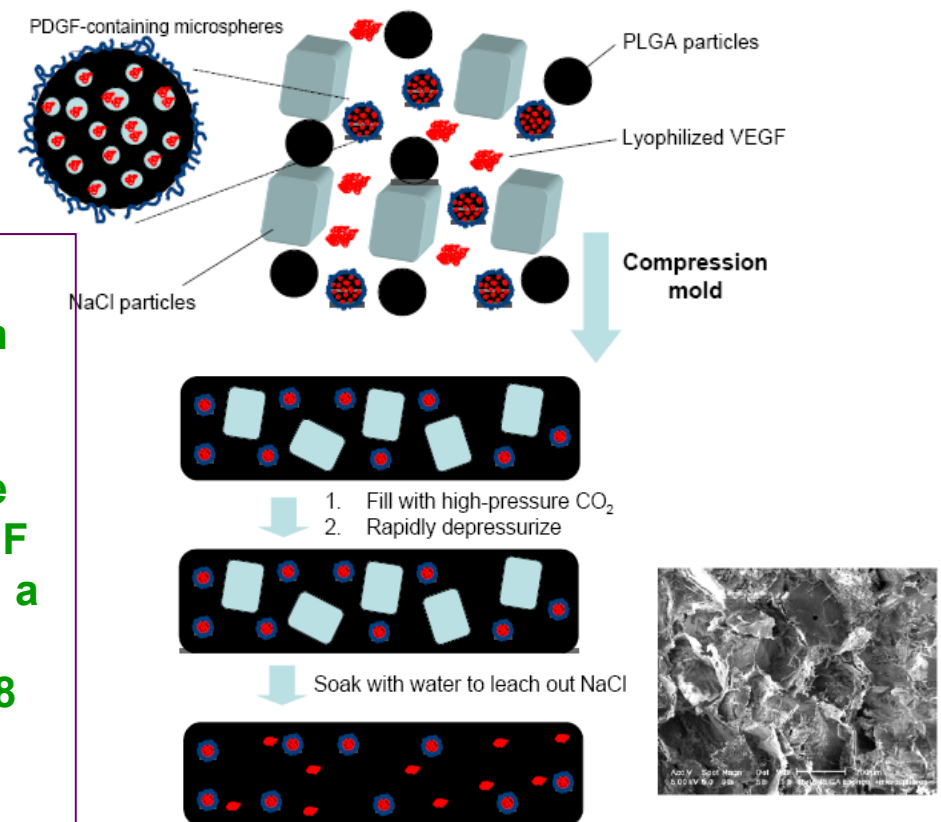
Rilascio di fattori di crescita (GF) da scaffold

Induzione della vascolarizzazione negli scaffold

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

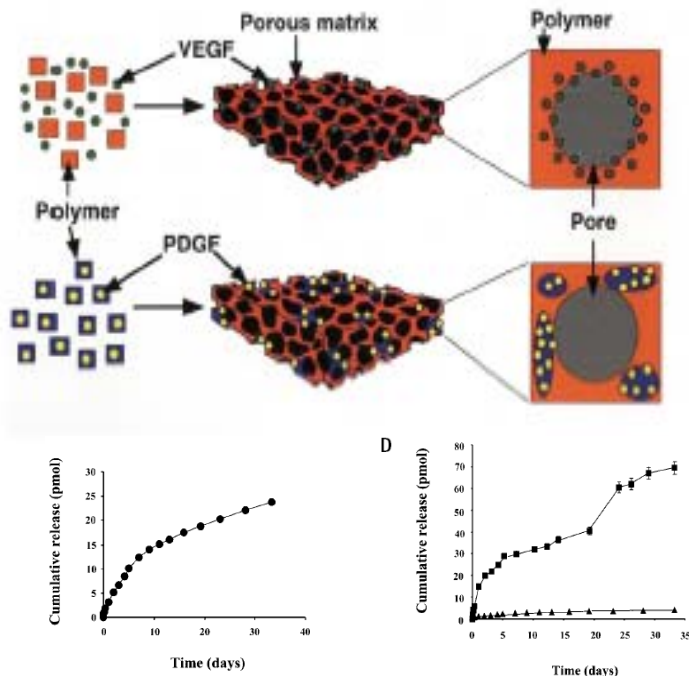
Processo di fabbricazione:

- PDGF incapsulato in microsferiche 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



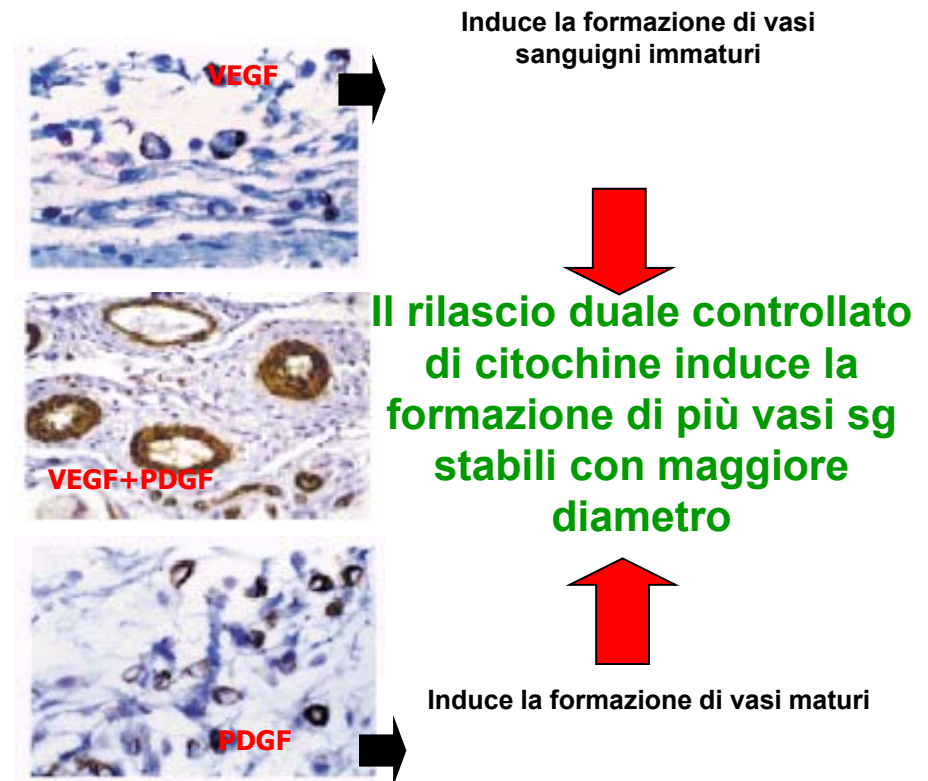
Rilascio di fattori di crescita (GF) da scaffold

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.

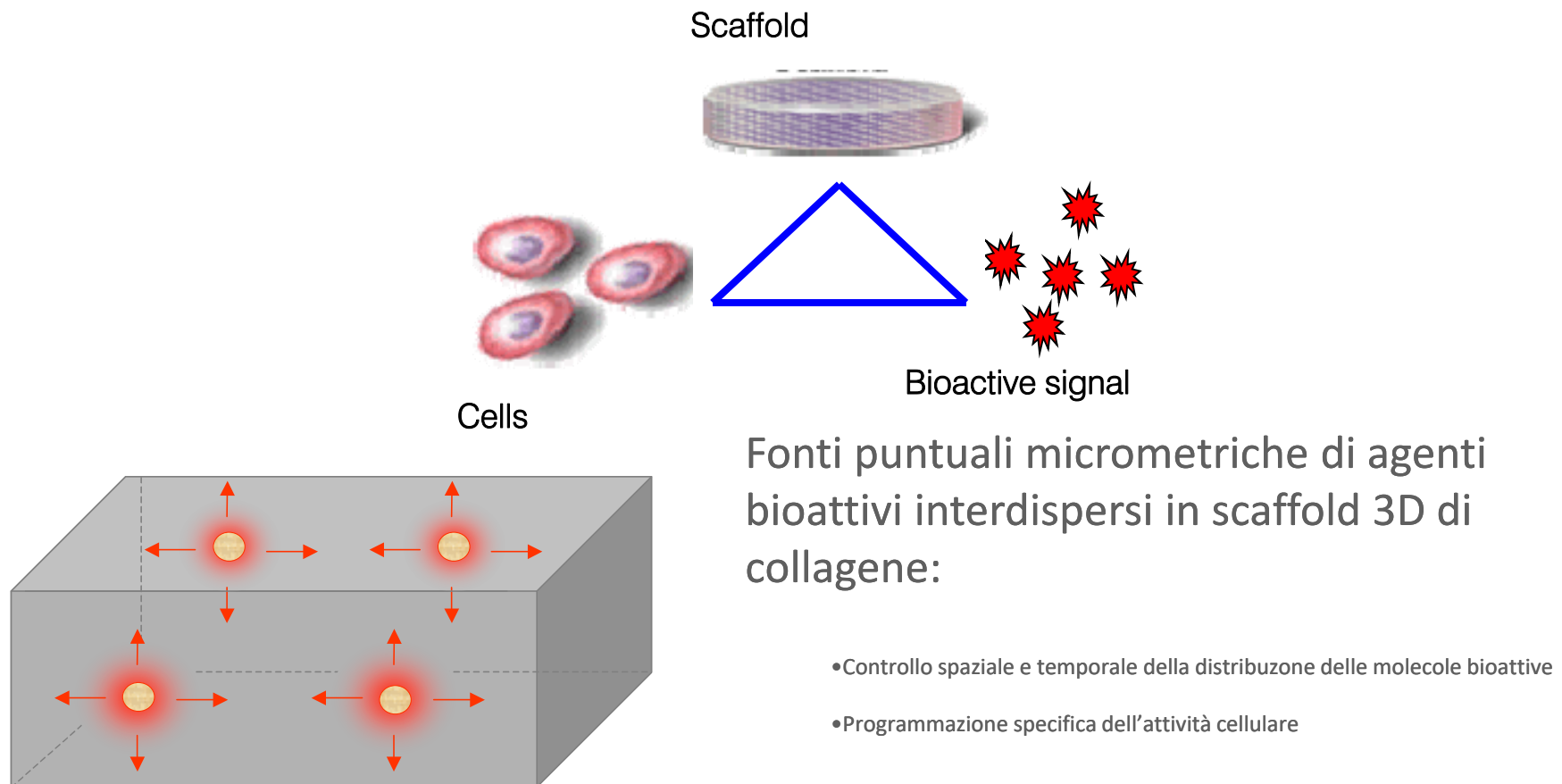


Drawback

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

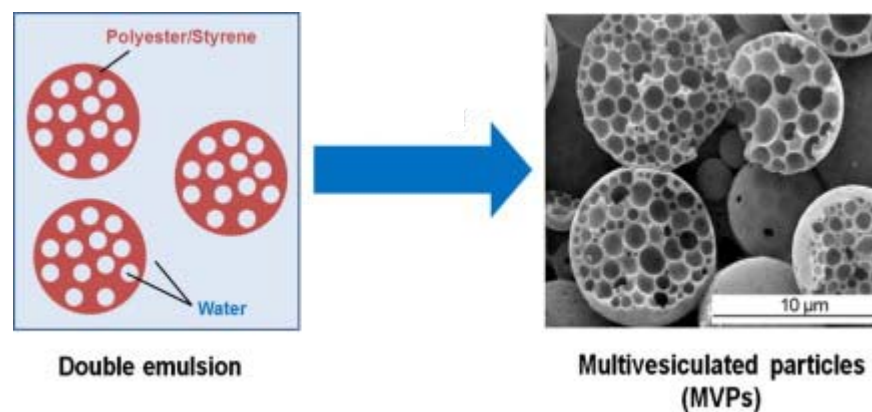
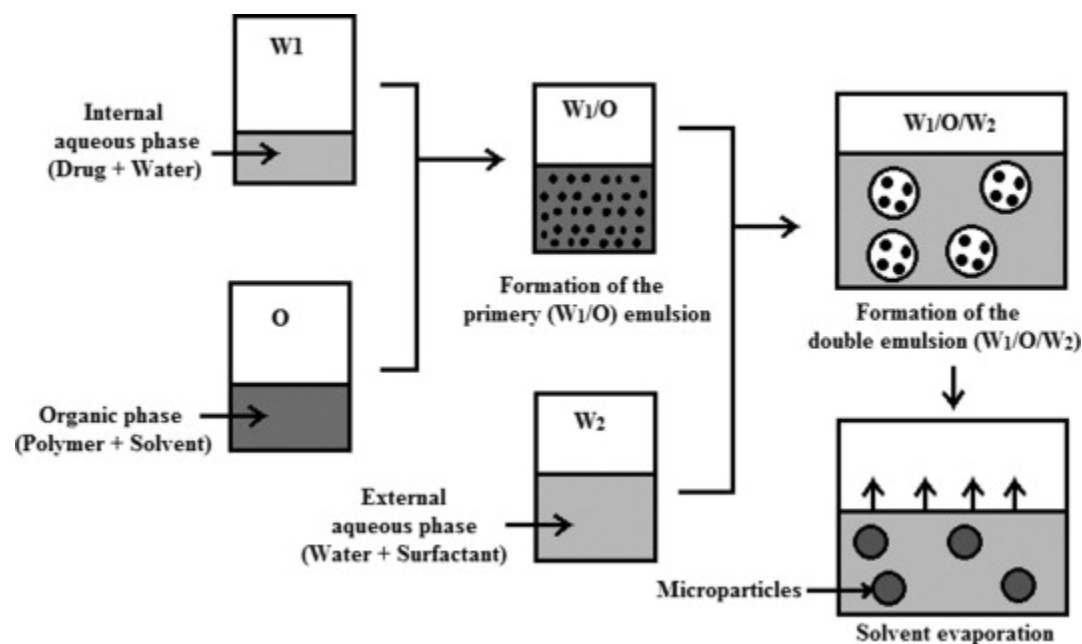


Codifica cronoprogrammata di segnali biologici in matrici 3D

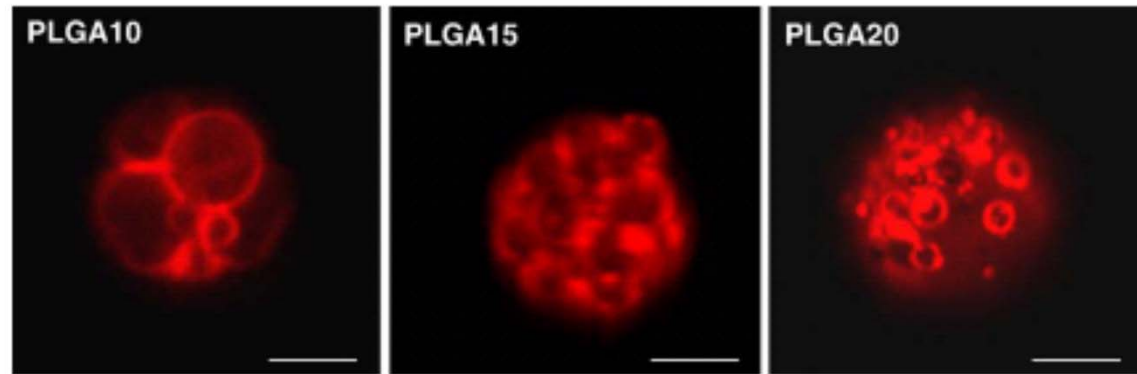
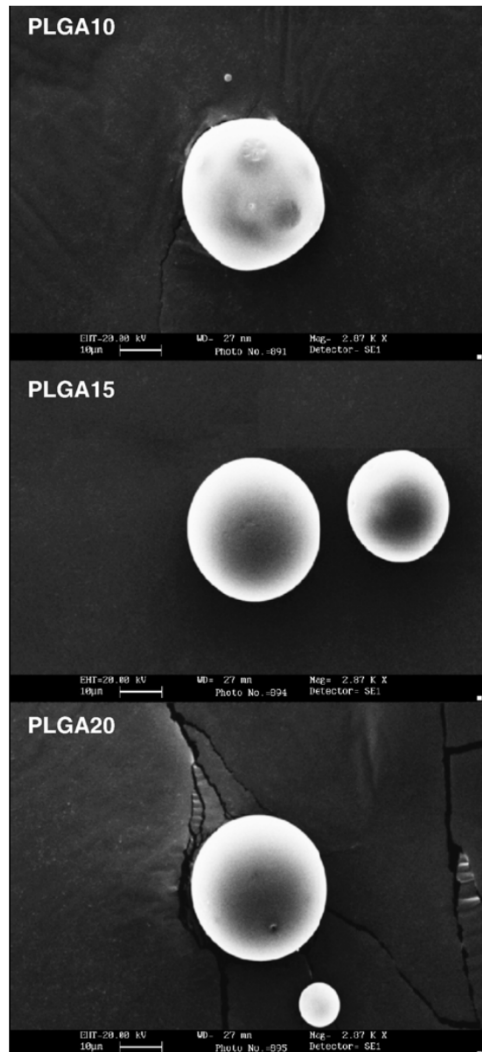


Microcarrier di PLGA caricati con l'agente

Microcarrier per fattori bioattivi



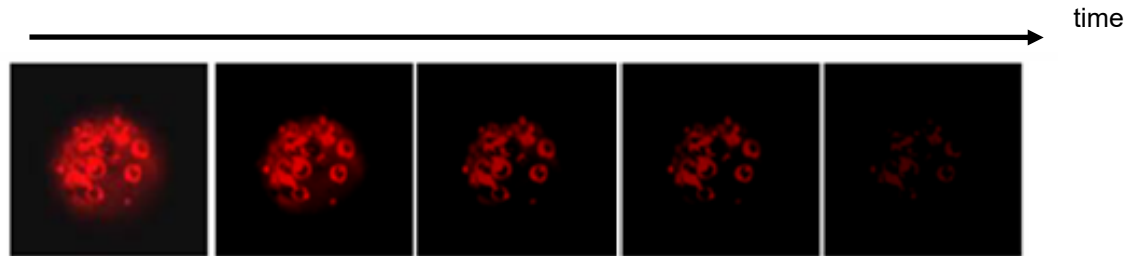
Microcarrier per fattori bioattivi



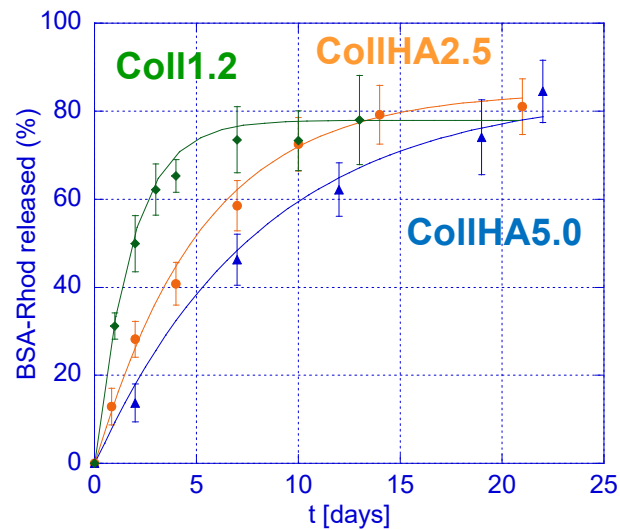
- Velocità di degradazione e di rilascio modulabile
- Efficienza di caricamento elevata e modulabile

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

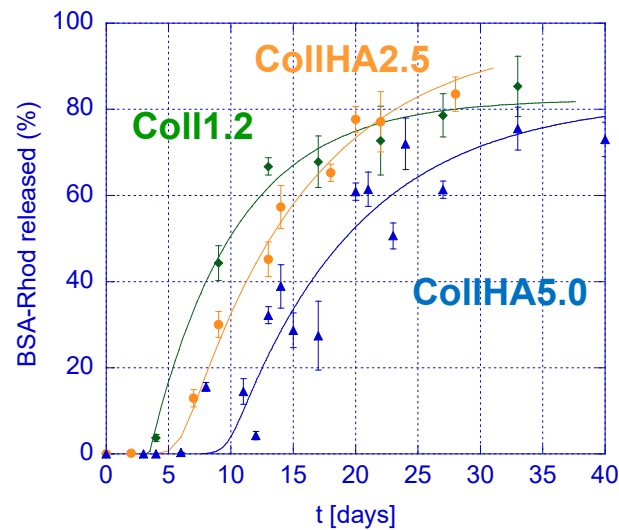
Cinetiche di rilascio



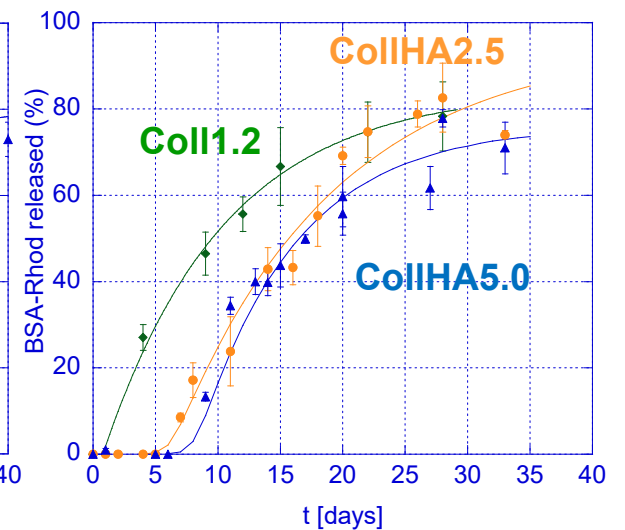
PLGA10



PLGA15

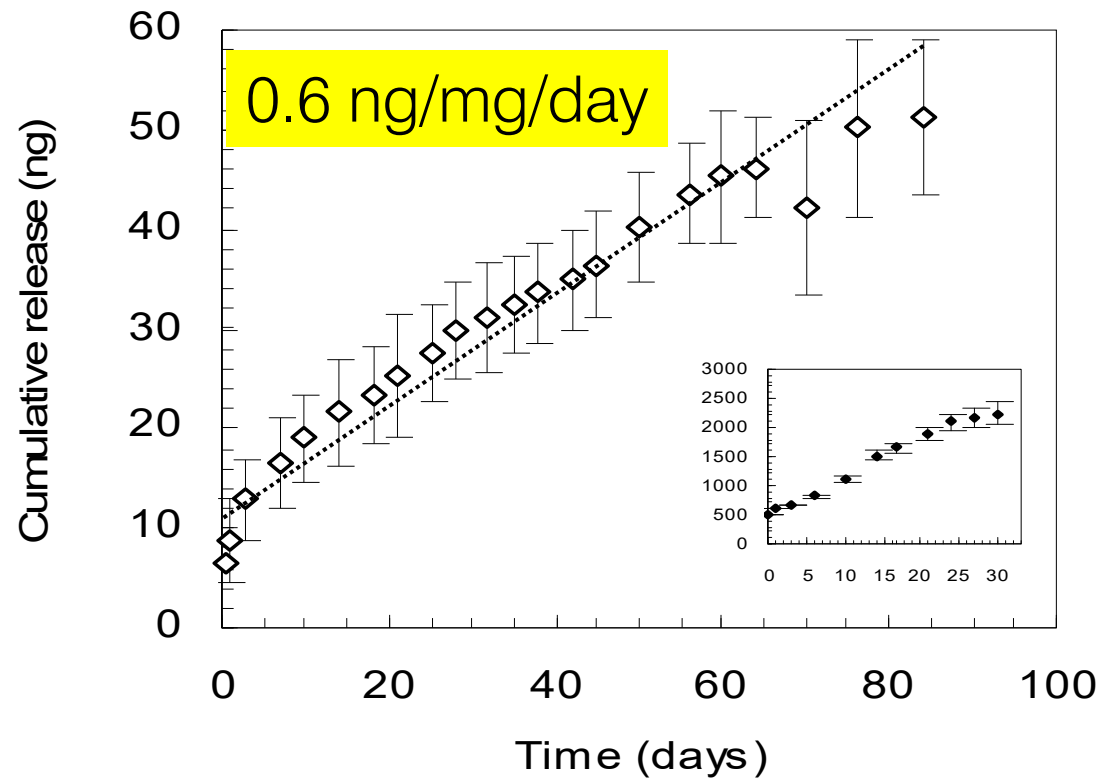
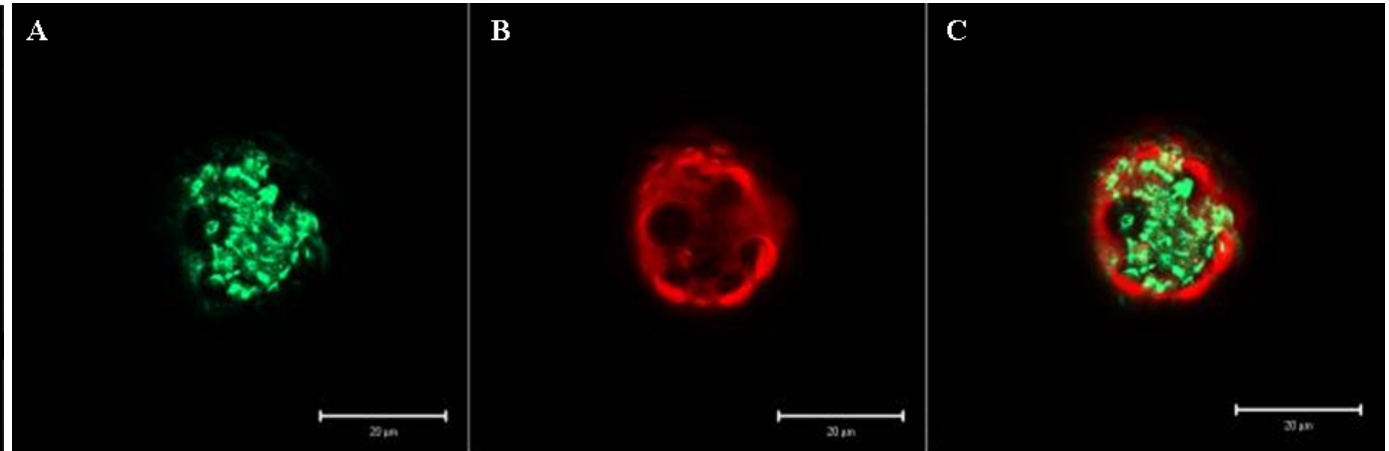
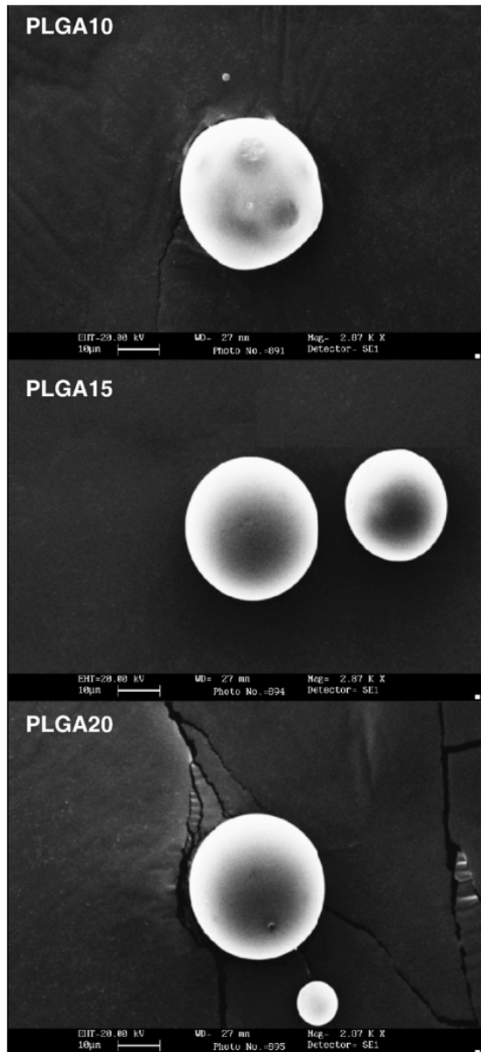


PLGA20

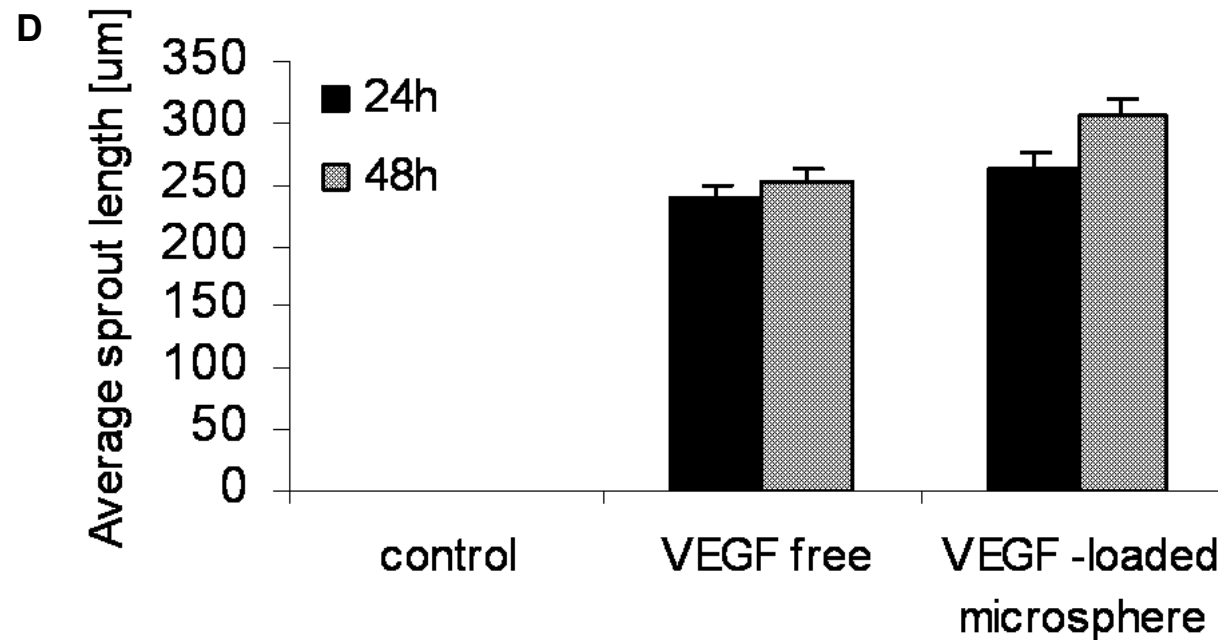
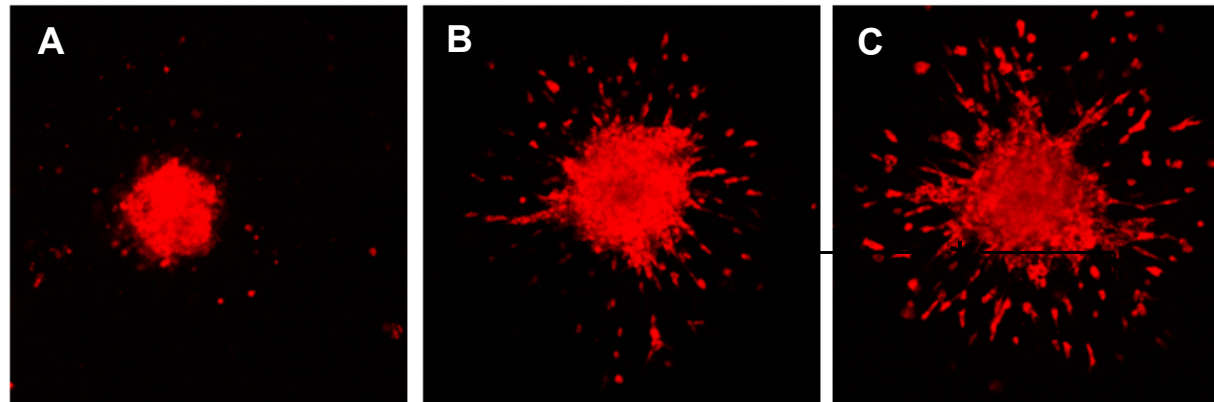


- ✓ Il rilascio della proteina dipende dalla natura idrofila dello scaffold e può essere modulata dalla formulazione di microsfeere

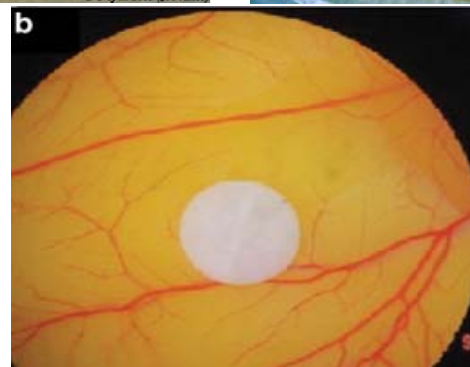
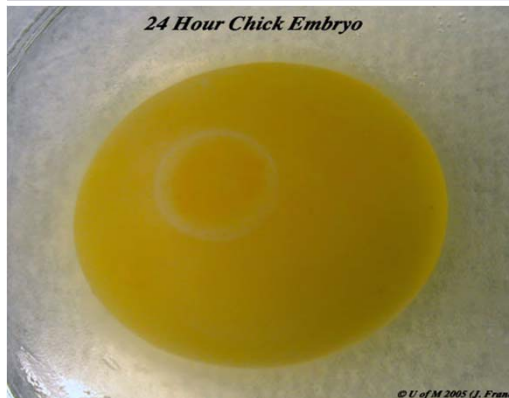
Microcarrier caricati con VEGF



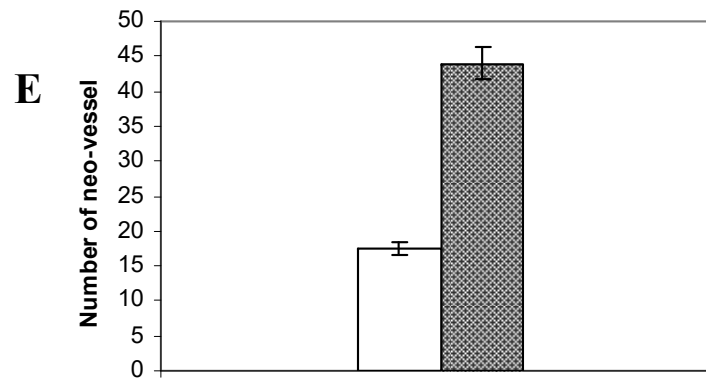
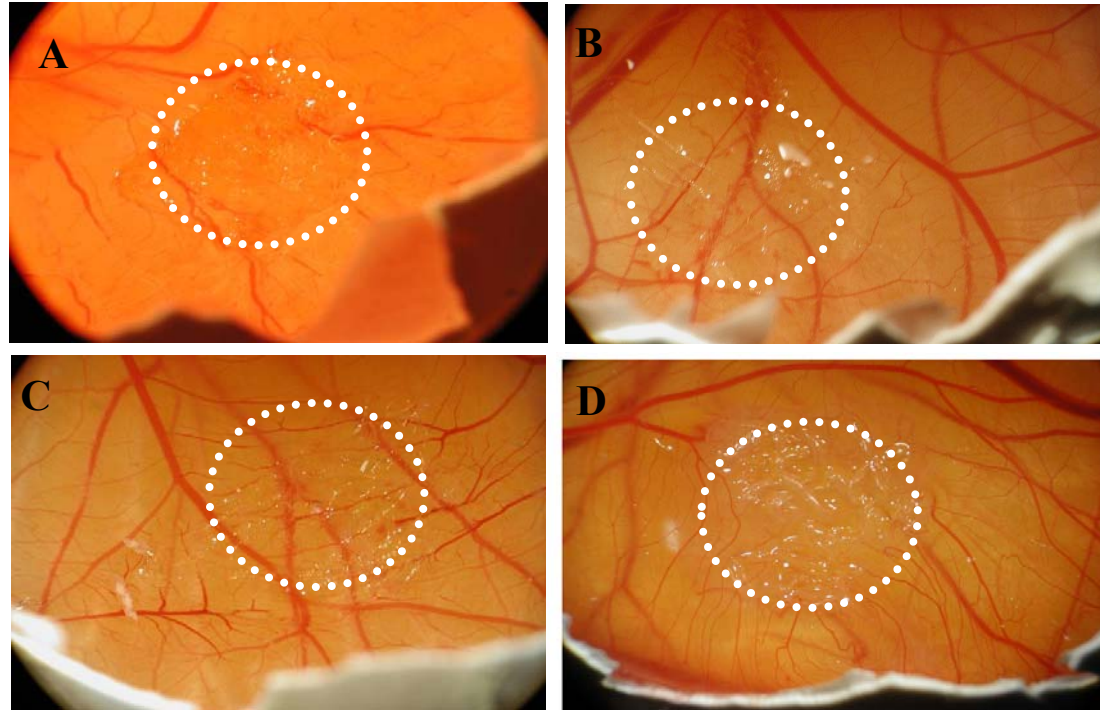
Scaffold di collagene attivati con VEGF



Saggio CAM



Risultati saggio CAM



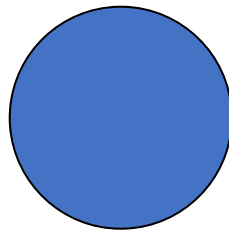
Borselli et al, JBMR, 2010

Scaffold multifunzionali bioattivati

Preparazione delle microparticelle

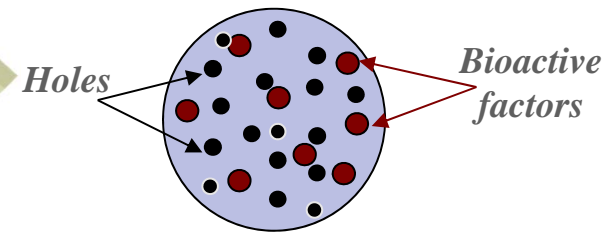
EMULSIONE SINGOLA

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



DOPPIA EMULSIONE

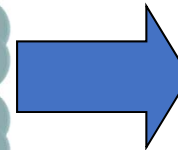
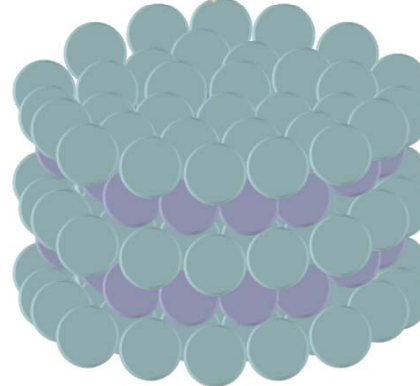
Preparazione di microsfere porose, caricate con fattori bioattivi utilizzando polimeri solubili (W/O/W) o non solubili (O/W/O) in acqua.



Sinterizzazione/
Stampaggio



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



CASD/CASM

Luciani et al, Biomaterials, 2008

Scaffold multifunzionali bioattivi

CASM

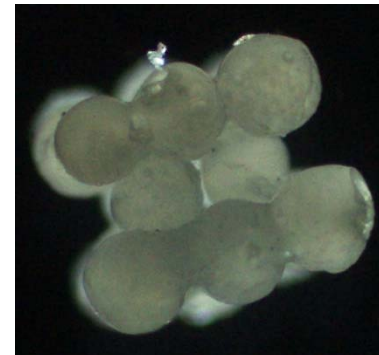
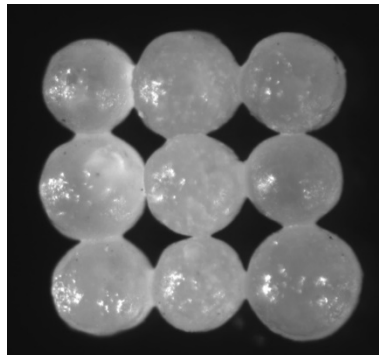
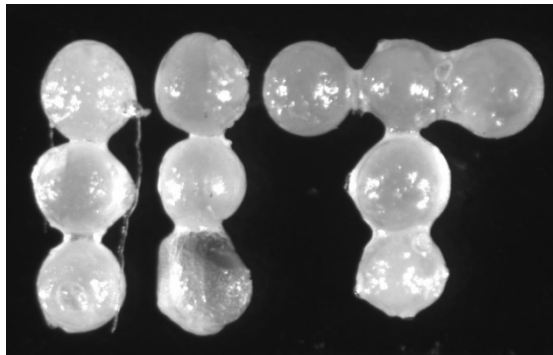
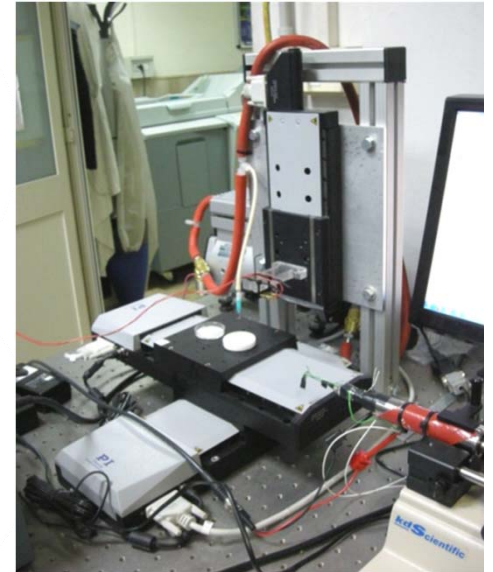
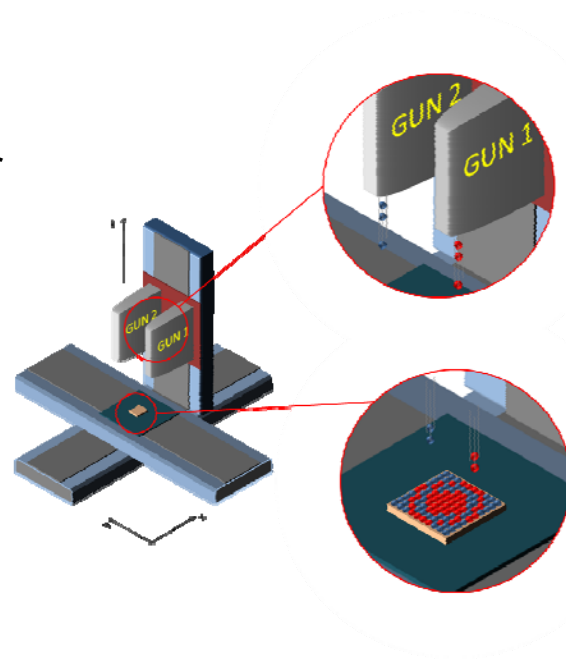
- Input: CASD model file
- Output: 3D scaffold built layer-by-layer

Specifications

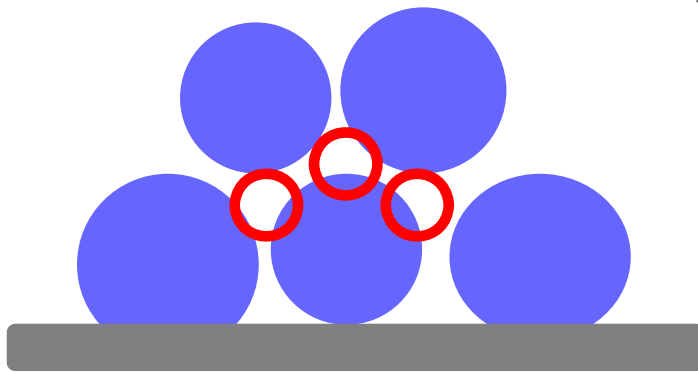
- Porosity
- Density
- Single μ -particle position

Elements

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



Scaffold multifunzionali bioattivati



Temperatura
o
solventi

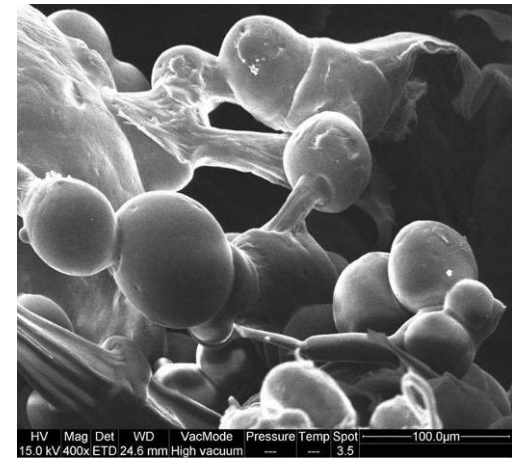
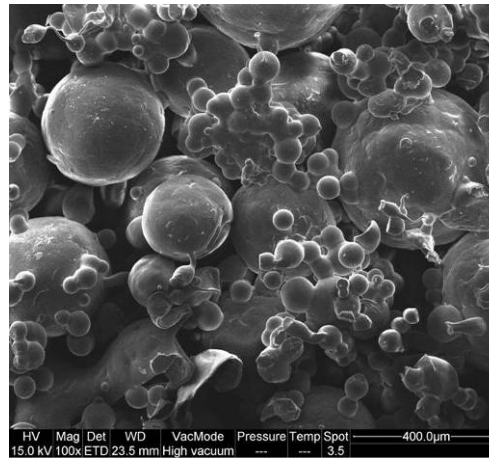
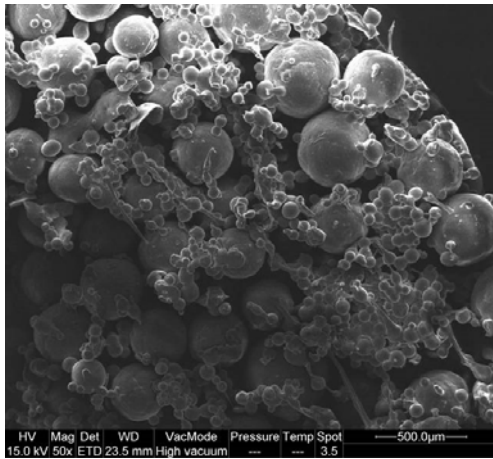
Porosità



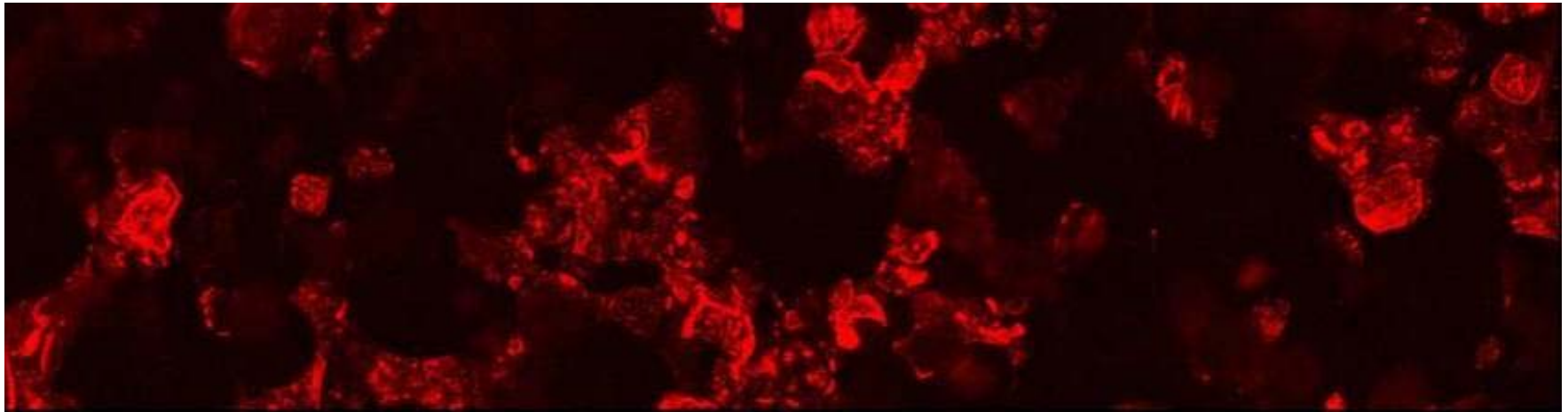
Campioni

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)	

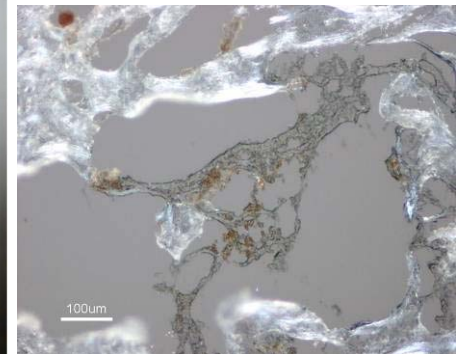
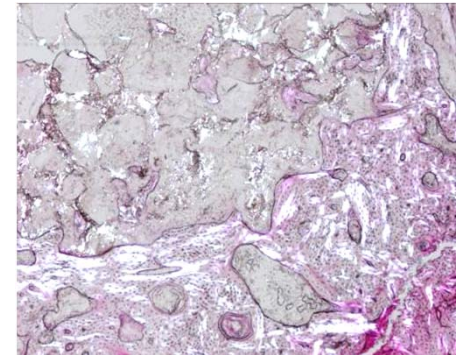
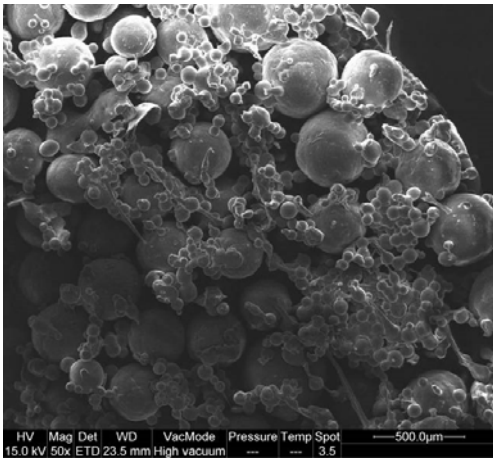
Morfologia e distribuzione agente bioattivo



Distibuzione 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

