



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI
“FEDERICO II”



DOTTORATO IN SCIENZE VETERINARIE XXXIII CICLO

Tesi di Dottorato

“Engineered platforms for the controlled release of biomolecules for tissue regeneration”

Autore

Dott.ssa Carmela Pizzoleo

Tutor

Prof.ssa Chiara Attanasio

Coordinatore

Prof. Giuseppe Cringoli

Indice	
Abstract	Pag.5
Introduzione	
1. Ingegneria dei tessuti	Pag.7
2. Bibliografia	Pag.11
Capitolo 1	
1.1 Angiogenesi embrionale	Pag.14
1.1.2. Angiogenesi post-natale fisiologica	Pag.18
1.1.3. Angiogenesi tumorale	Pag.23
1.2. Rimodellamento e regressione vascolare	Pag.25
1.3. Fattori di crescita	Pag.28
1.4. Bibliografia	Pag.30
Capitolo 2	
2.1 Introduzione	Pag.35
2.2 I biomateriali	Pag.36
2.2.1. Biomateriali naturali	Pag.38
2.2.1. a Biomateriali naturali a base di proteine	Pag.38
2.2.1. b Biomateriali naturali a base di polisaccaridi	Pag.43
2.2.3 Biomateriali sintetici	Pag.45
2.2.3.a Polimeri sintetici	Pag.45
2.2.3.b Ceramiche e vetri bioattivi	Pag.46
2.3 Gradienti di concentrazione di fattori di crescita	Pag. 48
2.4. Ingegneria del tessuto osseo basata sull'utilizzo di cellule mesenchimali	Pag. 52
2.5. Applicazioni dell'ingegneria dei tessuti alla medicina veterinaria	Pag 54
2.6. Bibliografia	Pag.58
Capitolo 3	
3.1. Scopo del lavoro	Pag.67
3.2. Bibliografia	Pag.72

Capitolo 4

4. Materiali e metodi

4.1. Fabbricazione di <i>scaffolds</i> polimerici	Pag.73
4.1.1. <i>Scaffolds</i> fabbricati con la tecnica di <i>salt leaching</i>	Pag. 73
4.1.2. <i>Scaffolds</i> fabbricati con la tecnica della sinterizzazione termica	Pag. 74
4.1.3. <i>Scaffolds</i> fabbricati con la tecnica di replica molding	Pag. 76
4.1.4 Fabbricazione di microparticelle di PLGA caricate con VEGF	Pag.79
4.2. Studio <i>in vitro</i> : interazione cellula-materiale	Pag.80
4.2.1. Studio su <i>scaffolds</i> ottenuti attraverso la tecnica di <i>salt leaching</i>	Pag.80
4.2.2. Studio su <i>scaffolds</i> ottenuti attraverso la tecnica di sinterizzazione termica	Pag. 82
4.2.3. Studio su <i>scaffolds</i> fabbricati attraverso la tecnica di <i>replica molding</i>	Pag. 82
4.2.4. Analisi statistica	Pag. 83
4.3. Saggi di angiogenesi	Pag. 83
4.3.1. Analisi statistica	Pag.84
4.4. Studio in vivo: valutazione del grado di vascolarizzazione degli <i>scaffolds</i>	Pag. 84
4.4.1. Perfusione con Microfil ed espianto dei costrutti	Pag. 85
4.4.2. Analisi istologica	Pag. 85
4.4.3. Analisi statistica	Pag.85
4.5. Studio di microfluidica	Pag.86
4.5.1. Disegno e fabbricazione del dispositivo	Pag.86
4.5.2. Preparazione della matrice	Pag. 88
4.5.2. a Funzionalizzazione del collagene con eparina	Pag. 88
4.5.2. b Reazione di immunofluorescenza	Pag. 90
4.5.2. c Saggi di angiogenesi in piastra	Pag. 90
4.5.3. Caratterizzazione di un gradiente di concentrazione con molecola modello	Pag. 91

4.5.4. Simulazione numerica	Pag. 93
4.5.5. Studio del gradiente di concentrazione di VEGF	Pag. 93
4.5.6. Studio dell'effetto biologico di un gradiente di concentrazione di VEGF	Pag. 94
4.6. Bibliografia	Pag.96

Capitolo 5

5.Risultati

5.1. Interazione cellula-materiale	Pag. 97
5.1.1. Studio su <i>scaffolds</i> di PCL fabbricati con la tecnica <i>salt leaching</i>	Pag. 97
5.1.2. Studio su <i>scaffolds</i> di PCL fabbricati con la tecnica di sinterizzazione termica	Pag.99
5.1.3. Studio su <i>scaffolds</i> fabbricati con la tecnica di <i>replica molding</i>	Pag.101
5.2. Saggio di angiogenesi <i>in vitro</i>	Pag. 103
5.3. Studio <i>in vivo</i>	Pag. 105
5.3.1. Analisi del potenziale angiogenico via μ -TAC	Pag. 105
5.4. Integrazione degli <i>scaffolds</i> con l'organismo ospite	Pag.109
5.5. Studio in microfluidica	Pag. 110
5.5.1. Studio di funzionalizzazione del collagene in piastra	Pag.110
5.5.2. Saggio di angiogenesi in piastra	Pag.111
5.5.3. Caratterizzazione del gradiente di concentrazione generato all'interno del dispositivo di microfluidica	Pag. 112
5.5.4. Simulazione mediante software COMSOL	Pag.116
5.5.5. Studio del gradiente di concentrazione di VEGF all'interno del dispositivo di microfluidica	Pag.116

5.5.6. Studio dell'effetto del gradiente di concentrazione di VEGF su
cellule bEND Pag.118

5.6.3. Studio dell'effetto di un gradiente di concentrazione di VEGF su
cellule HUVEC Pag.119

Capitolo 6

6.1. Pag.122

6.2. Bibliografia Pag.127

Abstract

Tissue engineering (TE) is a branch of biomedical engineering that involves many disciplinary fields. TE, indeed, applies the principles of engineering and biology through the development of biocompatible substitutes potentially able to reconstruct, maintain, or improve tissue functions. A very relevant area of interest in TE is oriented to the design, fabrication and validation of scaffolds devoted to improve tissue regeneration by boosting the recovery of physiological morpho-functional conditions.

The aim of this PhD thesis project was to enhance the interaction of a specific scaffold with biological systems through the fabrication of a construct able to modulate the angiogenic process and, therefore, tissue regeneration in a space and time-controlled manner.

In this context, we produced a scaffold made of polycaprolactone and poly (lactic - co - glycolic) featured by specific structural characteristics and assembled by using different techniques. In particular, our approach was based on the creation of microelements, the so-called building-blocks, to create modular scaffold depending on the architecture and the assembly technique selected. These constructs were, therefore, characterized by a controlled porosity and a tailored functionalization relying on the insertion of micro-depots able to release bioactive molecules in a controlled fashion. The chosen molecule was, in our case, the vascular endothelial growth factor (VEGF) since we aimed to generate a morphogen gradient of concentration to guide angiogenesis. To evaluate the best concentrations to be integrated into the scaffold, we performed a study based on the use of a microfluidic device targeted to reproduce the mechanical and biochemical stress that blood flow physiologically exerts on endothelial cells. Through the use of this device we observed that the endothelial cells, when stimulated via a VEGF concentration gradient, reacted by a qualitatively different tubulogenic pattern in the different areas of the device, confirming that

the stimulation was actually exerted in the different areas by different concentrations. The information gained through the microfluidic experiments were essential to rationalize the process of scaffold functionalization by integrating into the construct depots placed in specific positions and loaded with a specific amount of biomolecule. In conclusion, we suggest the proposed approach in order to better control angiogenesis and, thus, scaffold integration and tissue regeneration after implantation.

Introduzione

1. Ingegneria dei tessuti

L'ingegneria dei tessuti è stata definita dalla National Science Foundation come “un campo interdisciplinare che applica i principi dell'ingegneria e della biologia attraverso lo sviluppo di sostituti biocompatibili che ricostruiscono, mantengono o migliorano le funzioni tissutali” (Langer et al., 1993).

La perdita di una porzione più o meno estesa di un tessuto o di un organo è una delle più frequenti problematiche in medicina, in particolare nei settori della chirurgia plastica e ricostruttiva. In tali campi di applicazione l'ingegneria dei tessuti è una valida opzione, in quanto tessuti ingegnerizzati artificiali o bioartificiali possono sostituire i tessuti danneggiati ripristinandone, totalmente o parzialmente, la funzione fisiologica (Vacanti, 1994). L'ingegneria dei tessuti si basa sull'utilizzo di tessuti e/o costrutti bioartificiali costruiti in laboratorio, destinati ad essere utilizzati prima in studi preclinici e, successivamente, nella pratica clinica, a scopo terapeutico una volta impiantati nel paziente. Cute e cartilagine ingegnerizzate sono state i primi tessuti ad essere impiegati in campo clinico (Kremer et al., 2000), successivamente l'impiego è stato esteso ad altri tessuti quali il tessuto epatico (Ohashi et al., 2005), osseo (Salgado et al., 2004) muscolare (Deasy et al., 2004), adiposo (Dolderer et al., 2004) e nervoso (Lundborg, 2004).

Naturalmente ciascuna tipologia di costrutto ingegnerizzato presenta caratteristiche diverse a seconda del tessuto che si intende riprodurre. La cartilagine bioartificiale, ad esempio, è un tessuto piuttosto semplice in quanto riproduce un tessuto che è fisiologicamente avascolare in virtù di una ridotta domanda metabolica. Per questo motivo la cartilagine bioartificiale è costituita da matrici naturali come il collagene o il condroitin–solfato insieme a materiali sintetici come i siliconi (Suzuki et al., 2020; Liu et al., 2017).

Nel caso di tessuti vascolarizzati, invece, si parla di costrutti tridimensionali complessi all'interno dei quali la sopravvivenza cellulare è inficiata da una richiesta di ossigeno che viene soddisfatta in modo limitato a causa di una ridotta capacità di diffusione dello stesso, come anche dei nutrienti, all'interno del tessuto. Per questo motivo la sopravvivenza cellulare e la funzionalità del tessuto impiantato tendono a ridursi gradualmente con il passare del tempo (Colton, 1995, Sekiya et al., 2017).

Nonostante l'organismo umano presenti delle proprietà intrinseche per quanto riguarda la rigenerazione tissutale, l'entità del processo di riparazione varia sia in base al tipo di lesione che alle caratteristiche della malattia stessa (Lee et al., 2014). Per questo motivo, l'approccio più diffuso in ingegneria dei tessuti si basa sull'utilizzo combinato di uno *scaffold* (da *échafaud*, impalcatura) e cellule insieme, o in alternativa, a molecole bioattive con l'obiettivo di guidare sia la formazione del tessuto neoformato che l'integrazione dello scaffold con il tessuto dell'ospite (Saleha et al., 2018).

Una delle modalità principali attraverso cui l'ingegneria dei tessuti mira a promuovere i processi rigenerativi consiste nello sviluppo di biomateriali atti a richiamare diverse tipologie cellulari, a veicolare e rilasciare molecole bioattive, a fungere da impalcature strutturali con l'obiettivo di conferire le necessarie proprietà meccaniche ai nuovi tessuti in via di formazione. Un altro aspetto di grande rilievo relativamente alla scelta del materiale è la biodegradabilità: il biomateriale ideale, infatti, dovrebbe degradarsi in un arco di tempo quanto più possibile sovrapponibile a quello richiesto per lo sviluppo del nuovo tessuto nel sito di impianto (Fig.1) (Ivanov et al., 2019).

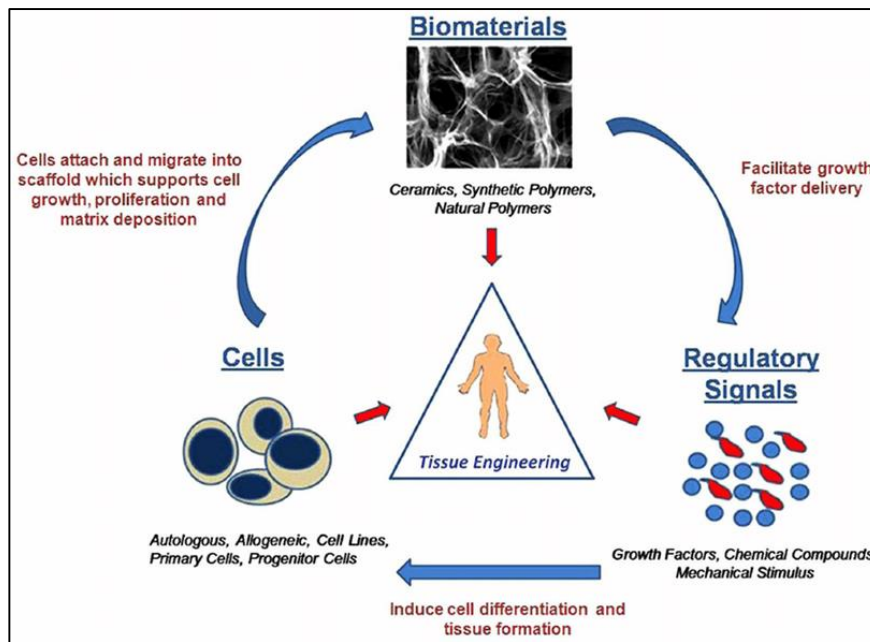


Figura 1: L'immagine descrive le tre componenti che giocano un ruolo fondamentale nel campo dell'ingegneria dei tessuti. Affinché un processo rigenerativo si svolga attraverso i normali processi fisiologici, l'ingegneria dei tessuti si avvale di componenti in grado di mimare la matrice extracellulare. In primo luogo, si serve di *scaffolds* costituiti da diversi biomateriali in grado di fornire strutture e substrati per lo sviluppo dei tessuti. All'interno di tali costrutti, talvolta, vengono integrate molecole bioattive in grado di guidare, attraverso vie di segnale, i processi rigenerativi attraverso l'induzione di una serie di eventi biologici (Murphy C. et al., *Cell. and Mat.* 2013).

Le molecole bioattive, invece, giocano un ruolo di notevole importanza nello stimolare la proliferazione ed il differenziamento cellulare, intervenendo, dunque, in modo decisivo nella modulazione del processo rigenerativo.

Per composti bioattivi si intendono molecole segnale di diversa natura quali proteine, polisaccaridi, lipidi e acidi nucleici o anche piccole molecole come metaboliti primari e secondari. Tuttavia, non è la presenza di queste molecole ad indurre principalmente un effetto guida sui processi rigenerativi ma, soprattutto, il modo in cui queste molecole entrano a far parte di tali processi al fine di mimare quanto accade fisiologicamente nel corso di un determinato evento biologico (Gillitzer *et al.*, 2001).

Per questo motivo i moderni approcci mirano a guidare i processi di rigenerazione tissutale attraverso l'utilizzo di fattori di crescita rilasciati in modo tale da simulare le condizioni fisiologiche. Il successo dell'utilizzo di tali molecole si avvale del fatto che queste innescano la cascata di segnali che normalmente vengono "somministrati" alle cellule. In conclusione, la branca dell'ingegneria dei tessuti in cui si inquadra il presente lavoro di tesi si configura come una disciplina basata sull'utilizzo combinato di impalcature polimeriche in grado di rilasciare molecole segnale, come i fattori di crescita, in modo da innescare una rigenerazione tissutale controllata nello spazio e nel tempo nel distretto anatomico di interesse dell'organismo ospite (Akar *et al.*, 2015).

2. Bibliografia

1. R., Langer and J.P. Vacanti, Tissue engineering. *Science* (1993) 260, 920
2. A. Vacanti J. Upton, Tissue-Engineered Morphogenesis of Cartilage and Bone by Means of Cell Transplantation Using Synthetic Biodegradable Polymer Matrices *Clinics in Plastic Surgery* (1994) 21, 445-462
3. M. Kremer, E. Lang and A. C. Berger. Evaluation of dermal-epidermal skin equivalents ('composite-skin') of human keratinocytes in a collagen-glycosaminoglycan matrix (Integra TM Artificial Skin) *British Journal of Plastic Surgery* (2000), 53, 459-465
4. K. Ohashi, J.M. Waugh, M.D. Dake, T. Yokoyama, H. Kuge, Y. Nakajima, M. Yamanouchi, H. Naka, A. Yoshioka, and M.A. Kay, Liver tissue engineering at extrahepatic sites in mice as a potential new therapy for genetic liver diseases. *Hepatology* (2005) 41, 132
5. A.J. Salgado, O.P. Coutinho, and R.L Reis,. Bone tissue engineering: state of the art and future trends *Macromol Biosci* (2004) 4, 743
6. B.M. Deasy, Y. Li, and J. Huard, Tissue engineering with muscle-derived stem cells. *Curr Opin Biotechnol* (2004) 15, 419
7. J.H. Dolderer, M.W. Findlay, J. Cooper-White, E.W. Thompson, N. Trost, O. Hennessy, A. Penington, W.A. Morrison and G. Germann, In vivo tissue engineering of vascularised adipose tissue for reconstructive surgery: An important step towards human application. *Langenbecks Arch Surg* (2004) 389, 453
8. G. Lundborg, Alternatives to autologous nerve grafts. *Handchir Mikrochir Plast Chir* (2004) 36, 1

9. A. Suzuki , M. Minamide , C. Iwaya , K. Ogata and J. Iwata Role of Metabolism in Bone Development and Homeostasis *Int. J. Mol. Sci.* (2020), 21, 8992
10. Y. Liu , G. Zhou, Y. Cao, Recent Progress in Cartilage Tissue Engineering Our Experience and Future Directions *Engineering* (2017) 3, 28–35
11. C.K. Colton, Implantable bio - hybrid artificial organs. *Cell Transplant* (1995) 4, 415
12. S. Sekiya and T. Shimizu Introduction of vasculature in engineered three-dimensional tissue, *Inflammation and Regeneration* (2017) 37:25
13. E. J. Lee, F. K. Kasper, and A. G. Mikos, Biomaterials for Tissue Engineering *Ann Biomed Eng.* (2014) 42(2): 323–337
14. L.S. Saleha and S. J. Bryanta, The Host Response in Tissue Engineering: Crosstalk Between Immune cells and Cell-laden Scaffolds *Curr Opin Biomed Eng.* (2018) 6: 58–65
15. A. N. Ivanov, M. S. Saveleva, M. N. Kozadaev, O. V. Matveeva, Yu E. Sal'kovskiy, G. P. Lyubun, D. A. Gorin and I. A. Norkin1 New Approaches to Scaffold Biocompatibility Assessment *BioNanoScience* (2019) 9:395–405
16. C. M. Murphy, F. J. O'Brien, D. G. Little and A. Schindeler Cell-scaffold interaction in the bone tissue engineering triad. *European Cells & Materials* (2013) 26, 120 - 132

17. V. Bambole and J. V. Yakhmi Tissue engineering: use of electrospinning technique for recreating physiological functions. *Nanobiom Soft Tissue Engineering* (2016) 5, 387 – 455

18. W. Zhuo, L. Liao, Y. Fu, T. Xu, W. Wu, S. Yang, and J. Tan Efficiency of Endovenous Versus Arterial Administration of Mesenchymal Stem Cells for Ischemia-Reperfusion–Induced Renal Dysfunction in Rats. *Transplantation Proceedings* (2013), 45, 503–510

19. R. Gillitzer and M. Goebeler Chemokines in cutaneous wound healing. *Journal of Leukocyte Biology* (2001) 69, 513 – 521

20. B. Akar, B. Jiang, S. I. Somo, A. A. Appel, J. C. L. Kenneth, M. Tichauer, E. and M. Brey Biomaterials with persistent growth factor gradients in vivo accelerate vascularized tissue formation *Biomaterials* (2015) 72 61e73

21. M. W. Laschke, Y. Harder, M. Amon, I. Martin J. Farhadi, A. Ring, N. Torio - Padron, R. Schram, M. R. Cker, D. Junker, J.M. Hauffel, C. Carvalho, M. Heberer, G. Germann, B. Vollmar, and M. D. Menger Angiogenesis in Tissue Engineering: Breathing Life into Constructed Tissue Substitutes *Tissue Engineering* (2006) 12, 2093 – 21.

Capitolo 1

1.2 Angiogenesi embrionale

Il successo del processo di rigenerazione di un qualsiasi tessuto dipende strettamente dalla rapidità con la quale si formano nuovi vasi sanguigni nel distretto anatomico danneggiato essendo essi responsabili del trasporto di nutrienti ed ossigeno alle cellule che andranno a costituire il tessuto neoformato (Carmeliet, 2003).

Il *primum movens* della rigenerazione tissutale è, dunque, l'angiogenesi, ossia il processo che conduce alla formazione di nuovi vasi sanguigni a partire da vasi preesistenti (Hanahan *et al.*, 1996).

Il sistema vascolare e quello linfatico penetrano all'interno di organi e tessuti al fine di fornire alle cellule ossigeno e sostanze nutritive, oltre che provvedere alla circolazione dei fluidi, al trasporto delle molecole segnale e all'allontanamento delle scorie (Nagy *et al.*, 2008).

Il processo di formazione del sistema vascolare, meglio noto come vasculogenesi, è uno dei primi eventi che si svolgono nel corso dell'embriogenesi. Durante lo sviluppo embrionale, le cellule del mesoderma, il foglietto tissutale embrionale intermedio che si forma durante la gastrulazione, si differenziano in cellule progenitrici, gli emangioblasti. Tali cellule rappresentano i precursori di due citotipi, le cellule ematopoietiche (HSC) e le cellule endoprogenitrici (EPC) che, insieme, danno origine ai vasi sanguigni (Munro *et al.*, 2017).

Gli emangioblasti, tuttavia, subiscono un ulteriore differenziamento in angioblasti, la cui aggregazione dà vita a quello che viene definito "isolotto sanguigno". Quest'ultimo, fondendosi insieme ad altri isolotti, forma il plesso vascolare primario dove, per la prima volta, si formano dei sottili capillari costituiti da cellule endoteliali differenziate (Gebala *et al.*, 2016).

La fase della vasculogenesi è completa quando si forma il plesso vascolare primario, mentre lo sviluppo successivo si svolge nel corso dell'angiogenesi post-natale (Fig.2) (Hen *et al.*, 2015).

Lo sviluppo del sistema embrionale vascolare è indipendente dalla domanda metabolica, diversamente da quanto accade nel corso dell'angiogenesi post-natale che avviene in risposta ad una richiesta specifica da parte dei tessuti ed è innescata da una condizione specifica, l'ipossia (Krock *et al.*, 2011).

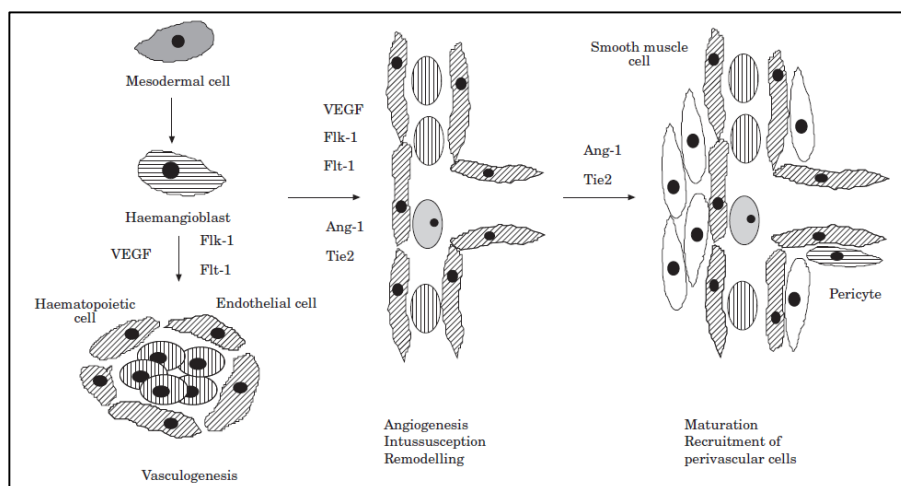


Figura 2: L'immagine descrive il ruolo dei recettori del fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF)/VEGF (VEGFR) e dei sistemi angiopoietina/Tie2 nello sviluppo vascolare embrionale. Nel dettaglio il VGF e i suoi recettori sono coinvolti nella formazione del processo della vasculogenesi che avviene a partire dal differenziamento dei progenitori mesodermici. Durante le fasi successive, ossia angiogenesi e rimodellamento i recettori reagiscono con il sistema Ang-1/Tie2 (Breier G., Placenta 2000).

Contestualmente alla vasculogenesi si svolge anche l'emopoiesi, la generazione delle diverse componenti del sangue, sia venoso che arterioso (Felmeden *et al.*, 2002) attraverso un processo caratterizzato dal continuo rinnovo dei diversi costituenti (Fig.3). L'emopoiesi è il processo che, a partire dalle cellule staminali ematopoietiche (HSC) porta alla produzione delle cellule del sangue nel corso della vita. Le HSC sono definite in modo univoco dalla loro capacità di rinnovarsi nel tempo e di generare cellule staminali figlie. Man mano che si differenziano, le HSC danno origine a una serie di cellule progenitrici intermedie che, attraverso una serie di graduali cambiamenti, permettono il raggiungimento dello stadio di cellule mature (Doulatov *et al.*, 2012).

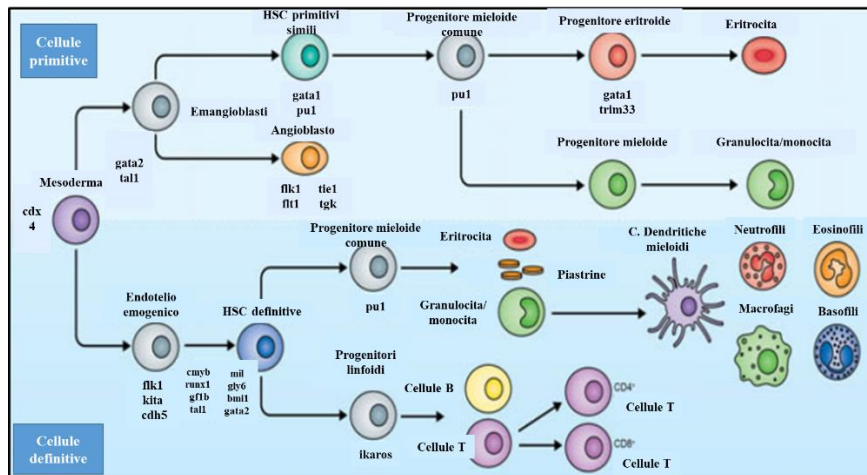


Figura 3: L'immagine mostra le diverse fasi dell'emopoiesi, ossia della formazione delle diverse componenti cellulari del sangue. È un processo che parte da cellule del mesoderma, le quali subiscono una serie di trasformazioni prima in precursori delle HSC mentre, successivamente, attraverso specifiche vie di segnalazione, si evolvono in HSC definitive per poi differenziarsi nelle diverse linee cellulari del sangue (Bogdan M. J. *et al.*, Dev.2013).

Nel corso della vita embrionale il sangue si forma in seno al sacco vitellino che ne rappresenta, quindi, il primo sito di formazione, successivamente, nel caso dei globuli rossi, sarà il fegato il principale organo deputato alla produzione. Solo nello stadio adulto il midollo osseo rappresenta l'unico sito di produzione sia dei granulociti che dei globuli rossi attraverso una serie di processi complessi, graduali e consecutivi a partire appunto dalle HSC. Il processo si svolge durante lo sviluppo embrionale e durante l'età adulta all'occorrenza. Come si può osservare l'emangioblasto dà origine a eritrociti e ad angioblasti primitivi, *Hematopoietic Stem Cell* (HSC), in modo transitorio. Nel corso dell'emopoiesi definitiva l'endotelio emogenico dà origine a HSC multipotenti, che possono differenziarsi verso una specifica linea cellulare tra le diverse che costituiscono la componente cellulare del sangue (Bogdan *et al.*, 2013).

L'angiogenesi, così come la vasculogenesi, si basa su meccanismi molecolari complessi che implicano una funzione regolatoria da parte di numerosi fattori di crescita.

In particolare, tra i fattori di crescita che governano i meccanismi molecolari responsabili della vasculogenesi ricordiamo il fattore di crescita dei fibroblasti (FGF) che induce il mesoderma della placca laterale, posto nella zona periferica dell'isolotto sanguigno, a formare gli angioblasti e quello della placca parassiale, posto al centro dell'isolotto sanguigno, a formare le cellule ematopoietiche (Hen et al., 2015); il fattore di sviluppo dell'endotelio vascolare (VEGF), invece, presenta un recettore, il VEGF-R1, che interviene nel processo di formazione degli angioblasti ma non nella maturazione funzionale del vaso sanguigno (High, 2008).

Il VEGF-A e i recettori VEGF-A, VEGFR-1 e VEGFR-2, sono coinvolti nella formazione del sistema vascolare primitivo a partire dal differenziamento dei progenitori mesodermici e quindi nel processo della vasculogenesi. Durante i successivi processi di angiogenesi e rimodellamento, i recettori del VEGF agiscono in sinergia con il sistema Ang-1/Tie2, coinvolto nella maturazione del sistema vascolare attraverso la mediazione delle interazioni tra cellule endoteliali e cellule di supporto perivascolari.

Il VEGF promuove anche l'assemblaggio dei vasi stimolando la migrazione degli angioblasti e delle cellule muscolari lisce della parete vasale. Negli adulti il VEGF supporta aspetti rilevanti relativi alla funzione delle cellule muscolari, come la promozione della rigenerazione e la regolazione della capacità contrattilità (High, 2008).

Tuttavia, solo il VEGF-R2 è in grado di avviare il differenziamento degli angioblasti, mentre l'espressione e il grado di attivazione di altri recettori del VEGF ne determinano la sopravvivenza (Fig.4) (Pandey et al, 2018).

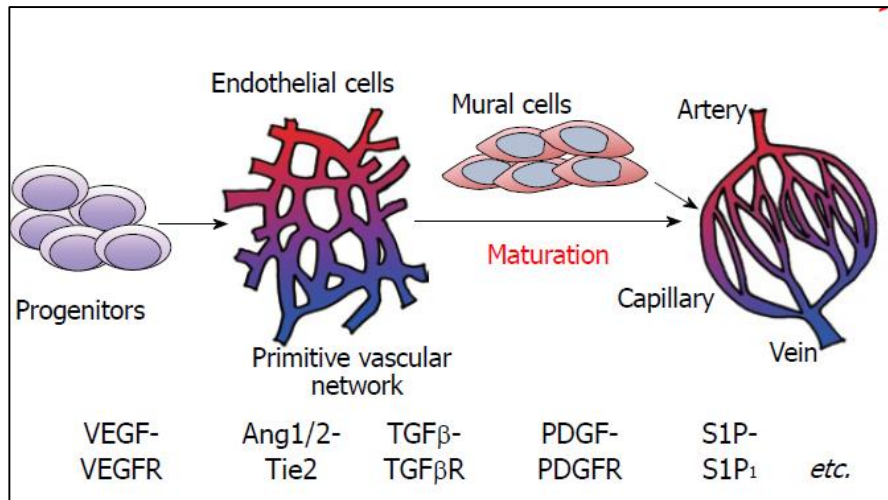


Figura 4: L'immagine riporta una rappresentazione schematica della formazione dei vasi sanguigni a partire dalle cellule progenitrici (Takuwa Y. *et al.* World J Biol Chem 2010).

1.1.2. Angiogenesi post-natale fisiologica

L'angiogenesi è un processo finemente regolato da un equilibrio tra fattori pro-angiogenici e fattori anti-angiogenici. Nel caso in cui questo equilibrio viene alterato si genera un processo angiogenico patologico (Yancopoulos *et al.*, 2000).

I meccanismi che regolano l'angiogenesi sono particolarmente complessi, in quanto la formazione di nuovi vasi sanguigni si svolge attraverso una serie di passaggi che comportano modifiche sostanziali sia dell'endotelio vascolare che della matrice extracellulare (ECM) (Bussolino *et al.* 1998).

Il primo evento che innesca il processo angiogenico è la destabilizzazione delle pareti dei vasi sanguigni preesistenti con successiva attivazione dei meccanismi di proliferazione e migrazione delle cellule endoteliali. Durante questa fase vengono rilasciati enzimi proteolitici quali le metalloproteinasi (MMPs,) con l'obiettivo di degradare la matrice extracellulare al fine di consentire il libero movimento delle cellule all'interno di essa (Rundhaug, 2005).

Successivamente, le cellule endoteliali tendono ad assemblarsi in strutture tubulari che costituiranno le pareti dei vasi sanguigni di nuova formazione.

Il terzo stadio, ossia la maturazione dei vasi neoformati, consiste nell'inibizione della proliferazione e della migrazione delle cellule dell'endotelio per permettere la stabilizzazione delle strutture neoformate e la loro fusione con i vasi preesistenti grazie ai periciti e alle cellule muscolari lisce che svolgono un ruolo fondamentale in questa fase (Karamysheva, 2007). In particolare, i periciti sono in comunicazione diretta tramite *tight-junctions* con le cellule endoteliali per formare le pareti dei capillari (Wang *et al.*, 2016). Durante la maturazione della rete vascolare, infatti, tali cellule permettono che i capillari si fondano a formare vasi, arterie e vene, di dimensioni maggiori. Le pareti dei capillari, esternamente all'endotelio, presentano un rivestimento costituito da periciti, mentre le pareti dei vasi di calibro maggiore sono formate da diversi strati di cellule muscolari. I periciti sono cellule di origine mesenchimale e comprendono una popolazione di cellule in grado di differenziarsi in diverse tipologie di cellule mesenchimali quali cellule muscolari lisce e fibroblasti (Fagiani *et al.*, 2012).

Durante il processo di angiogenesi un ruolo importante è svolto dal *Platelet-derived growth factor B* (PDGFB) il quale è secreto dalle cellule della punta, le *tip cells*, e trattenuto in prossimità del vaso in via di sviluppo dai proteoglicani. Questi ultimi svolgono la funzione di attrarre i periciti, i quali esprimono il recettore per il PDGF. L'*Angiopoietin* (Ang-1), espressa dalle cellule perivascolari, si lega e attiva il recettore Tie2, stimolando così la sopravvivenza delle cellule endoteliali, l'angiogenesi e il successivo attaccamento delle cellule murali. L'Ang-2, di derivazione endoteliale, invece, inibisce la segnalazione di Tie2. La *Sphingosine-1-phosphate* (S1P), rilasciata dalle piastrine o dalle cellule ematopoietiche, si lega e attiva i recettori S1P Edg sulle cellule endoteliali innescando così il segnale S1P1/Edg1 tramite la cascata Gi/MAPK. L'attivazione di tale cascata avviene allo scopo di stimolare la sopravvivenza cellulare e per mediare il traffico di N-caderina nelle giunzioni aderenti, stabilizzando così l'adesione cellulare endoteliale/murale. Qui, la S1PR segnala attraverso la via Gi indipendente tramite Rac

(S1P1/Edg1) e Rho (S1P3/Edg3) per stimolare l'adesione delle cellule endoteliali attraverso la VE-caderina. Il TGF prodotto dalle cellule endoteliali ne induce il differenziamento in *Smooth Muscle Cell* (SMC) tramite Alk5/Smad2/3. In particolare, a livello delle cellule endoteliali il TGF- può indurre sia il differenziamento, tramite Alk5/Smad2/3, che la proliferazione e la migrazione, tramite Alk1/endoglin/Smad1/5 (Fig.5)(Gaengel *et al.*, 2009).

Una componente fondamentale in grado di influenzare il processo di formazione dei vasi sanguigni è rappresentata dalla lamina basale, una componente caratterizzata da una costituzione sovrapponibile a quella della matrice extracellulare che separa l'endotelio dallo stroma adiacente. ed è composta da un reticolo di collagene di tipo IV intrecciato con una rete di laminina. Tale struttura è stabilizzata dal legame che l'entactina stabilisce tra il collagene e la laminina. Il perlecano, l'eparan solfato, i proteoglicani ed ulteriori molecole sono associate allo scheletro di collagene di tipo IV-laminina. È importante sottolineare che le lamine basali dei diversi tessuti differiscono proprio in virtù del nel rapporto tra questi diversi costituenti (Rodgers R.J. *et al.*, 2003).

Solo al termine della stabilizzazione della parete vascolare il processo angiogenico può ritenersi concluso ed il vaso sanguigno formato (Fig.6).

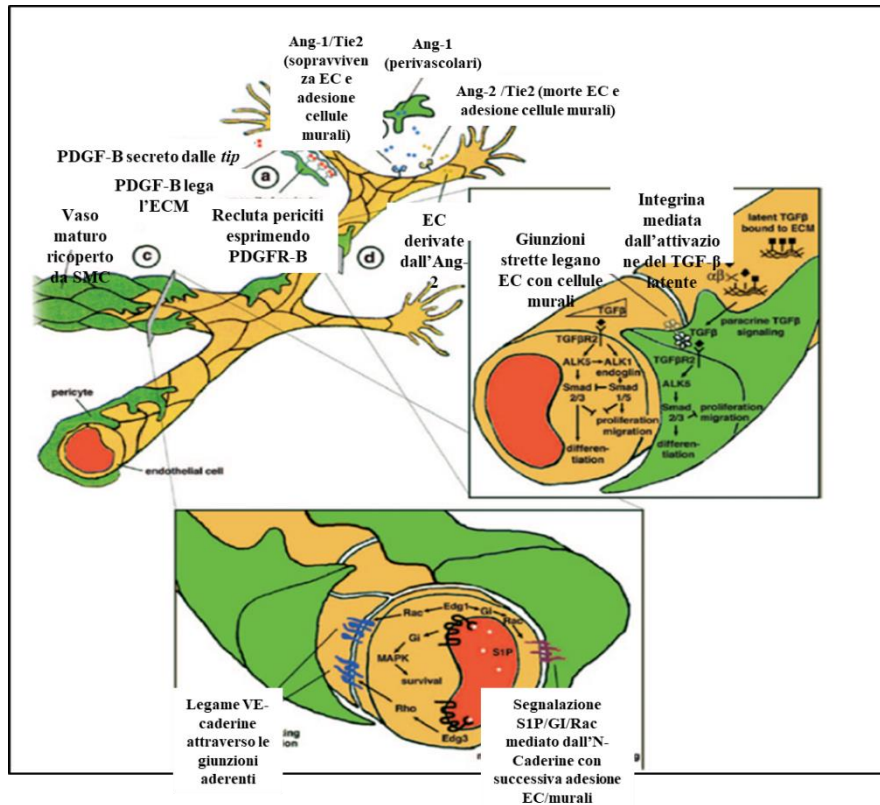


Figura 5: L'immagine descrive le vie di segnalazione coinvolte nella maturazione vascolare attraverso il differenziamento e il reclutamento delle cellule muscolari lisce e dei periciti. Attraverso diverse vie di segnalazione si arriva alla formazione del vaso sanguigno completo rivestito da cellule muscolari lisce e periciti (Gaengel K. *et al.*, Art. Thromb Vasc. Biol. 2009).

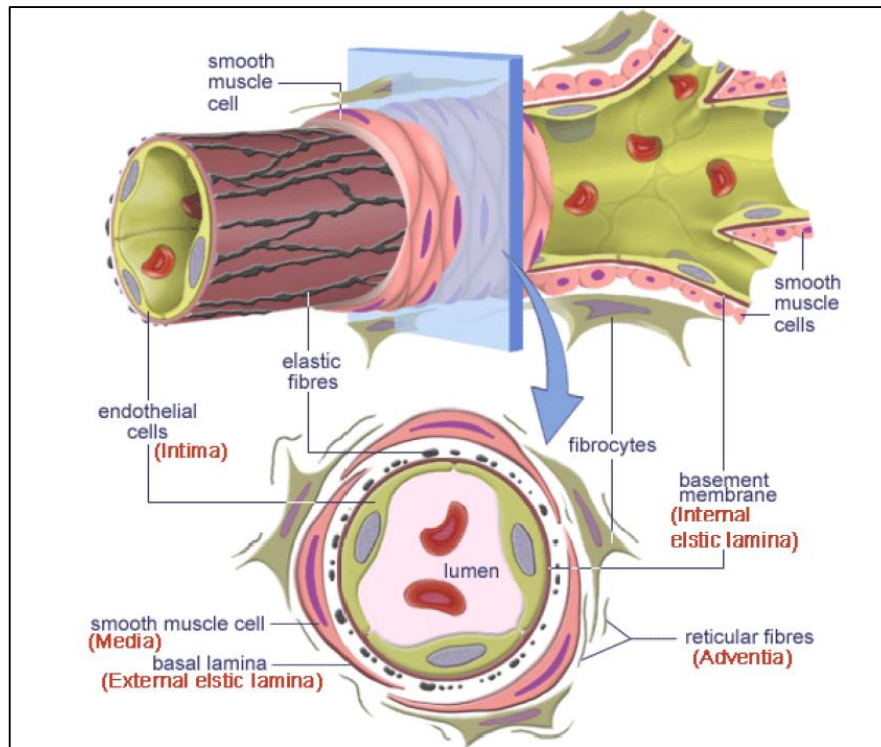


Figura 6: La figura rappresenta la struttura del vaso sanguigno. I vasi sanguigni di maggiore calibro, arterie e vene, presentano una parete spessa e resistente caratterizzata dalla presenza di tessuto connettivo e cellule muscolari lisce. Nel caso delle arterie sono presenti anche due lamine elastiche, interna ed esterna (Goyal P. Book 2005).

Come ulteriore meccanismo fisiologico ricordiamo l'angiogenesi intussusettiva in cui si verifica la formazione di due nuovi vasi sanguigni a partire da un vaso preesistente.

L'angiogenesi intussusettiva consiste nella formazione di due o più vasi sanguigni a partire da un unico vaso di dimensioni maggiori. Questo processo riveste un certo rilievo nella fase successiva alla vasculogenesi, quindi ancora una volta nella fase embrionale, momento in cui consente di ottenere un numero elevato di vasi senza implicare la necessità di un aumento del numero di cellule endoteliali. Nella zona di contatto in cui si inizia a verificare l'intussuscezione, si verifica una riorganizzazione delle *tight junctions* volta a consentire ai fattori di crescita, quali PDGF e VEGF, di diffondere. Periciti e fibroblasti iniziano, quindi, a depositare fibre di collagene favorendo la riorganizzazione delle cellule endoteliali nell'ambito della parete dei vasi neoformati (Mentzer *et al.*, 2014).

La formazione di vasi sanguigni può avvenire anche per vasculogenesi che, a differenza dell'angiogenesi, è un processo di neovascolarizzazione prenatale che si instaura a partire dalle cellule progenitrici endoteliali (Lugano *et al.*, 2020).

Tutti i processi descritti sono regolati attraverso un rilascio bilanciato di fattori angiogenici ed anti-angiogenici. Diversamente, il mancato equilibrio nel rilascio di questi fattori determina un'angiogenesi patologica (Lugano *et al.*, 2020).

1.1.4. Angiogenesi tumorale

Un'angiogenesi patologica è considerata un processo ritenuto alla base della progressione di molte patologie, tra cui la degenerazione maculare ed il cancro. Attraverso l'impiego di specifici marcatori è possibile operare una distinzione tra l'angiogenesi fisiologica e quella patologica.

Il principale meccanismo alla base dell'angiogenesi è la formazione di *sprouts*, germogli, che implica, in primo luogo, l'attivazione selettiva di cellule denominate *tip cells*. (Fig. 7) (Gupta *et al.*, 2003; Cotran *et al.*, 1999).

La *tip cell* corrisponde alla cellula che innesca la migrazione attraverso l'attivazione di un processo di inibizione laterale che impedisce alle cellule adiacenti di migrare insieme ad essa. In secondo luogo, si verifica l'estensione dello *sprout* quando la *tip cell* attivata migra grazie a fenomeni di chemiotassi che inducono le cellule facenti parte del gambo del vaso a seguirne la migrazione. Infine, avviene la formazione del lume che connette lo spazio luminale dello *sprout* con quello del vaso parentale, grazie ad un processo di cavitazione delle cellule costituenti il germoglio, dando vita ad un'anastomosi vascolare (Lugano *et al.*, 2018). Quando i fattori pro-angiogenici sono prodotti in modo equilibrato, il sistema vascolare è quiescente il che significa che le cellule endoteliali non proliferano. La formazione dei vasi sanguigni è, invece, indotta quando i fattori pro-angiogenici sono dominanti, andando a costituire il cosiddetto *switch*, interruttore,

angiogenico (Folkman *et al.*, 1992). L'interruttore angiogenico permette che i tumori passino dallo stadio di quiescenza ad una condizione attiva caratterizzata da una rapida proliferazione di cellule maligne, nel caso di un'angiogenesi tumorale, e da un aumento tangibile di nuovi vasi sanguigni (Belgore *et al.*, 2001).

Questo processo può essere indotto da ulteriori alterazioni genetiche delle cellule tumorali, già responsabili di un'augmentata proliferazione cellulare (Bielenberg *et al.*, 2015; List, 2001).

Nel momento in cui è in atto un processo di angiogenesi tumorale, le cellule progenitrici endoteliali circolanti vengono reclutate per formare vasi all'interno delle masse tumorali (Lugano R. *et al.*, 2020).

Un altro meccanismo che porta alla formazione di vasi tumorali è il mimetismo vascolare. Tale processo consiste in una forma di rimodellamento in cui le cellule neoplastiche, attraverso una serie di mutazioni, diventano esse stesse cellule endoteliali (Maroufi *et al.*, 2020).

Infine, responsabile di angiogenesi tumorale, è anche un meccanismo di trans-differenziamento. In questo caso a differenza del precedente, sono le cellule staminali tumorali (CSC) che, subendo una riprogrammazione genetica, si differenziano in cellule endoteliali consentendo così la neovascolarizzazione della massa tumorale (Lugano *et al.*, 2020).

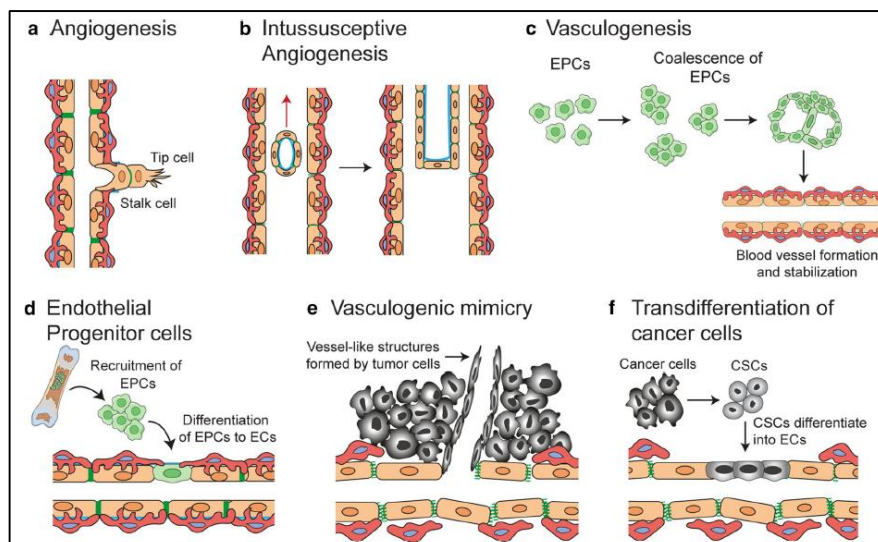


Figura 7: L'immagine descrive i diversi meccanismi di formazione dei vasi sanguigni in condizioni sia fisiologiche che di trasformazione neoplastica: a) angiogenesi classica basata sul con attivazione di cellule endoteliali in *tip cells* che vengono poi “seguite” dalle *stalk cells* a formare il nuovo vaso ; b)angiogenesi intussuscettiva, in cui da un unico vaso preesistente si formano due vasi; c) vasculogenesi, in cui le cellule endoprogenitrici attraverso un meccanismo di coalescenza e poi di cavitazione formano il nuovo vaso; (d) angiogenesi in corso di rigenerazione, in cui le cellule endoprogenitrici vengono reclutate dal midollo osseo e si differenziano in cellule endoteliali; (e) mimetismo vascolare, in cui le cellule tumorali formano canali vascolari mutando in cellule endoteliali; (f) transdifferenziamento delle cellule staminali tumorali in cellule endoteliali (Lugano R. *et al.*, 2020).

1.2. Rimodellamento e regressione vascolare

Il processo di rimodellamento dei vasi sanguigni che porta sia al cosiddetto *vascular pruning*, letteralmente “potatura vascolare”, che alla regressione del vaso stesso, è stato studiato per la prima volta nel corso dello sviluppo embrionale e, successivamente, nell’angiogenesi post-natale (Franco *et al.* 2015).

Il rimodellamento vascolare regressivo si verifica durante la riattivazione di vasi sanguigni adulti che si trovino in uno stadio di quiescenza, come per esempio nel corso della regressione del corpo luteo (Modlich *et al.* 1996). Quest’ultima, insieme al *vascular*

pruning, è considerata una forma di regressione fisiologica di gruppi micro-vascolari all'interno di un letto vascolare.

La luteolisi non rappresenta, infatti, altro che la rapida dissociazione del corpo luteo maturo al termine del ciclo ovarico. Attraverso una sotto-regolazione del VEGF ed una sovra-regolazione dell'Ang2, la rete vascolare del corpo luteo si dissolve completamente entro pochi giorni per indurre gradualmente la formazione di tessuto cicatriziale nel giro di poche settimane (Goede et al., 1998) a dimostrazione del fatto che esistono percorsi e meccanismi consolidati per la dissociazione controllata di letti vascolari. Ugualmente, il meccanismo della regressione può essere innescato dall'inattivazione del VEGF o dall'attivazione di altri fattori come l'ANG 2.

Poiché gli eventi di *pruning* e di regressione si rilevano anche in corso di angiogenesi neoplastica ne consegue che il loro controllo possa avere anche importanti implicazioni terapeutiche. Durante lo sviluppo tumorale, infatti, la massa neoplastica continua a crescere, ed il sistema vascolare ad essa connessa si espande, solo in seguito all'attivazione di fattori angiogenici. Le terapie anti-angiogeniche che mirano ad attivare il meccanismo di legame VEGF/VEGFR comportano il *pruning* dei vasi più immaturi lasciando immodificata una rete di vasi maturi considerata fisiologica (Carmeliet et al., 2011). Questo processo è stato denominato "normalizzazione vascolare" ed è alla base delle moderne terapie chemioterapiche.

Sono state identificate molteplici vie di segnalazione in cui sono coinvolti i regolatori della regressione vascolare. La via di segnalazione coinvolgente il sistema VEGF/VEGFR2, la via di segnalazione WNT canonica e la via di segnalazione indotta dal flusso sanguigno (Fig.8).

La via di segnalazione canonica WNT stabilizza il sistema della rete vascolare e promuove la proliferazione delle cellule endoteliali. La segnalazione via Notch supporta la regressione del vaso promuovendone la costrizione e inducendo la stasi del flusso sanguigno.

Mentre l'ANG1 sostiene la sopravvivenza delle cellule endoteliali, l'ANG2 destabilizza la rete vascolare, guidando la regressione.

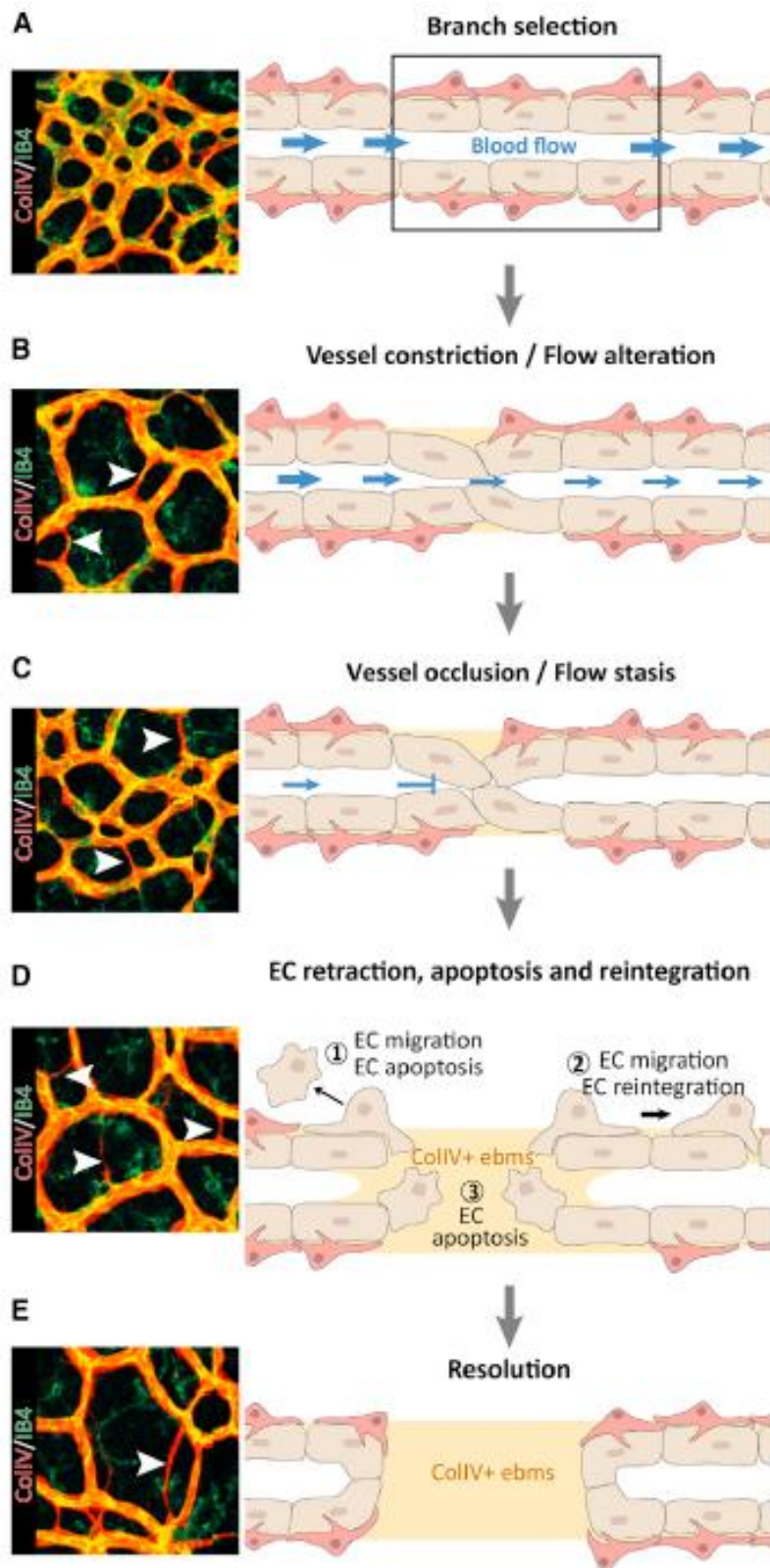


Figura 8: L'immagine descrive le diverse fasi del processo di *pruning* e regressione dei vasi. In A e B si evidenzia una compressione del vaso a seguito di un'alterazione del flusso. In C è rappresentata l'occlusione del vaso e la conseguente stasi del flusso ematico, in D è riportato che le cellule endoteliali possono migrare verso altri siti, andare in apoptosi o reintegrarsi nella parete del vaso principale mentre in E è rappresentato il termine del processo coincidente che il rimodellamento della rete vascolare (Korn C. *et al.*, 2015).

1.3. Fattori di crescita

Come già riportato, il mantenimento omeostatico dei vasi neoformati è reso possibile grazie all'azione equilibrata di fattori stimolanti e inibenti l'angiogenesi (Josko, 2000).

Queste molecole rappresentano un gruppo numeroso ed eterogeneo che le vede divise in tre classi:

- Fattori che agiscono sulle cellule endoteliali come il VEGF o l'ANG;
- Molecole che agiscono sul processo infiammatorio, come le citochine e le chemochine, oppure enzimi che agiscono sulla matrice extracellulare, come le MMPs;
- Sostanze che mediano il rilascio di fattori da parte di macrofagi, cellule endoteliali, infiammatorie e neoplastiche, come il fattore di necrosi tumorale (TNF) oppure il fattore di crescita trasformante (TGF).

Tuttavia, esistono anche delle proteine di membrana che agiscono nei processi di rimodellamento vascolare quale, per esempio, le proteine G (Papetti *et al.*, 2002).

In particolare, i principali fattori di crescita implicati nel processo angiogenico sono:

- Il VEGF: interviene nell'aumento della permeabilità delle cellule endoteliali ed è il primo fattore di crescita ad essere attivato durante l'angiogenesi stimolando la proliferazione e la migrazione cellulare attraverso la degradazione della membrana basale.
- L' ANG 1 e 2: l'angiopoietina 1 è l'antagonista dell'ANG 2 agendo sulla gemmazione delle cellule endoteliali e stabilizzando l'endotelio, al contrario dell'ANG 2 che destabilizza i vasi in vista di una migrazione cellulare verso siti diversi.

- L' FGF: fattore di crescita dei fibroblasti, amplifica e stimola la proliferazione delle cellule endoteliali permettendo la formazione del plasminogeno attivando l'u-plasminogeno (uPA) e la collagenasi all'interno della lamina basale stimolando così la riorganizzazione della struttura vasale.
- Il TGF – β : promuove la crescita dei fibroblasti, inibisce la proliferazione e la migrazione delle cellule endoteliali, promuove l'inibizione e la stimolazione delle strutture tubulari *in vitro* in funzione della concentrazione utilizzata; funge da segnale chemiotattico per monociti e fibroblasti nel corso dei processi infiammatori; aumenta la stabilità della parete vasale incrementando la produzione di collagene e migliorando l'azione delle MMPs (Chen WCW *et al.*, 2015).
- Il PDGF: fattore di crescita derivante dalle piastrine, permette la sintesi del DNA nelle cellule endoteliali; stimola le cellule muscolari lisce e i periciti a stabilizzare il vaso neoformato; induce l'espressione del VEGF e del VEGF-R2 nelle cellule endoteliali e contribuisce a stabilizzare la parete dei capillari.
- TNF- α : inibisce la proliferazione delle cellule endoteliali nel caso di processi infiammatori (Papetti *et al.* 2002).

1.2. Bibliografia

1. P. Carmeliet Angiogenesis in health and disease. *Nat. Med.* (2003), 9, 653-660
2. D. Hanahan, J. Folkman, Patterns and emergine mechanisms of the angiogenic switch durino tumorigenesis. *Cell* (1996), 86, 353-364
3. J. A. Nagy, L. Benjamin, Huiyan Zeng, Ann M. Dvorak and Harold F. Dvorak Vascular permeability, vascular hyperpermeability and angiogenesis *Angiogenesis* (2008) 11:109–119
4. D. A. D. Munro, P. Hohenstein and J. A. Davies Cycles of vascular plexus formation within the nephrogenic zone of the developing mouse kidney *Scientific Reports* (2017) 7: 3273
5. V. Gebala, R. Collins, I. Geudens, L. K. Phng, and Gerhardt, H. Blood flow drives lumen formation by inverse membrane blebbing during angiogenesis in vivo. *Nature Cell Biol.* (2016)18, 443–50
6. P. Carmeliet, R. K. Jain, Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* (2000), 407, 249-257
7. G. Breier Angiogenesis in Embryonic Development—A Review. *Placenta* (2000), 22, S11 – S15
8. G. Hen, J. Nicenboim, O. Maysel, L. Asaf, M. Shin, G. Busolin, R. Hofi, G. Almog, N. Tiso, N. D. Lawson and K. Yaniv Venous-derived angioblasts generate organ-specific vessels during zebrafish embryonic development. | *Development* (2015) 142, 4266-4278
9. B. L. Krock, N. Skuli, and M. C. Simon Hypoxia-Induced Angiogenesis: Good and Evil *Genes & Cancer* (2011) 2(12) 1117–1133

10. D.C. Felmeden, A.D. Blann, G.Y.H. Lip Angiogenesis: basic pathophysiology and implications for disease *European Heart Journal* (2003) 24, 586–603
11. S. Doulatov, F. Notta, E. Laurenti, and J. E. Dick Hematopoiesis: A Human Perspective, *Cell Stem Cell* (2012) 10, 120-136
12. M. J. Bogdan and L. I. Zon Hematopoiesis, *Development* (2013) 140, 2463-2467
13. J.J. High Role of VEGF in organogenesis, *Organogenesis* (2008) 4, 247-256
14. A. K. Pandey, E. K. Singhi, J. P. Arroyo, T. A. Ikizler, E. R. Gould, J. Brown, J. A. Beckman, D. G. Harrison, J. Moslehi Mechanisms of VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) Inhibitor–Associated, Hypertension and Vascular Disease *Hypertension* (2018) 71:e1–e8
15. J.E. Rundhaug Matrix metalloproteinases and angiogenesis *J Cell Mol Med* (2005) 9(2):267-85
16. J. D. Wang, E. Khafagy, K. Khanafer, S. Takayama, and M. E. H. ElSayed Organization of Endothelial Cells, Pericytes, and Astrocytes into a 3D Microfluidic in Vitro Model of the Blood–Brain Barrier *Mol. Pharmaceutics* (2016), 13, 895–906
17. A. F. Karamysheva Mechanisms of Angiogenesis *Biochemistry* (2008) 73, 7, 751- 762
18. G. D. Yancopoulos, S. Davis, N. W. Gale, J. S. Rudge, S. J. Wiegand and J. Holash Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* (2000), 407, 242-248

19. F. Bussolino, A. Mantovani and G. Persico Molecular mechanisms of blood vessels formation. *TIBS* (1998), 22, 251-256
20. E. Fagiani, G. Christofori Angiopoietins in angiogenesis *Cancer Lett.* (2012) 328(1):18-26
21. R.J. Rodgers, H.F. Irving-Rodgers Extracellular Matrix and Follicle Development *Encyclopedia of Hormones*, 2003
22. K. Gaengel, G. Genove', A. Armulik, C. Betsholtz Endothelial-Mural Cell Signaling in Vascular Development and Angiogenesis, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2009) 29,630-638
23. S. J. Mentzer and M. A. Konerding Intussusceptive Angiogenesis: Expansion and Remodeling of Microvascular Networks *Angiogenesis*. (2014) 17(3): 499–509
24. P. Goyal Dual function of LIMK2 in endothelial cells, *Book* (2005)
25. M. Papetti, I.M. Herman Mechanism of normal and tumor-derived angiogenesis". *American Journal Physiol. Cell Physiol.* (2002) 282: C947-C970
26. J. Folkman, Y. Shing Angiogenesis. *The Journal of Biological Chemistri* , (1992) 267, 16:10931-10934
27. F.M Belgore, G.Y. H Lip, M. Wadley et al. Plasma levels of vascular endothelial cell growth factor (VEGF) and its receptor (sFlt-1) in haematological cancers: a comparison with breast cancer. *Am J Haematol* (2001); 66:59–61
28. M.K. Gupta, R. Qin Mechanism and its regulation of tumor-induced angiogenesis *World Journal of Gastroenterology*, (2003) 9(6): 1144-1155

29. R.S. Cotran, V. Kumar, T. R. Collins Pathologic Basis of Disease
W.B. Saunders Company (1999), Sixth Edition

30. R. Lugano , K. Vemuri , D. Yu , M. Bergqvist, A. Smits, M. Essand,
S. Johansson, E. Dejana, A. Dimberg CD93 promotes beta1 integrin
activation and fibronectin fibrillogenesis during tumor angiogenesis.
J Clin Invest (2018) 128(8):3280–3297

31. R. Lugano, M. Ramachandran, A. Dimberg Tumor angiogenesis:
causes, consequences, challenges and opportunities Cellular and
Molecular Life Sciences (2020) 77:1745–1770

32. N.F. Maroufi, S. Taefehshokr, M.R. Rashidi, N. Taefehshokr, M.
Khoshakhlagh, A. Isazadeh, N. Mokarizadeh, B. Baradaran, M. Nouri
Vascular mimicry: changing the therapeutic paradigms in cancer
Molecular Biology Reports (2020) 47:4749–4765

33. A.F. List Vascular Endothelial Growth factor Signaling Pathway as an
Emerging Target in Hematologic Malignancies. The Oncologist,
(2001) Vol (6) (suppl.5):24-31

34. D. R. Bielenberg and B. R. Zetter, The Contribution of Angiogenesis
to the Process of Metastasis Cancer J. (2015); 21(4): 267–273

35. C.A. Franco, M.L. Jones, M.O Bernabeu, I. Geudens, , T. Mathivet,
A. Rosa, F.M. Lopes, A.P. Lima, A. Ragab, R.T. Collins et al.
Dynamic endothelial cell rearrangements drive developmental vessel
regression. PLoS Biol. (2015)13, e100212

36. U. Modlich, F.J Kaup., and H.G. Augustin, Cyclic angiogenesis and
blood vessel regression in the ovary: blood vessel regression during
luteolysis involves endothelial cell detachment and vessel occlusion.
Lab. Invest. (1996) 74,771–780

37. P. Carmeliet, and R.K. Jain, Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* (2011) 10, 417–427
38. C. Korn and H. G. Augustin Mechanisms of Vessel Pruning and Regression, *Developmental Cell* (2015) 34, 4-17
39. W. C. W. Chen, B. Péault, and J. Huard Regenerative Translation of Human Blood-Vessel-Derived MSC Precursors Stem Cells *International* (2015)11 1-12
40. J. Josko, B. Gwozdz, H. Jedrzejowska-Szypulka, S. Hendryk Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its effect on angiogenesis. *Med Sci Monit*, (2000) Vol 6(5): 1047- 1052.

Capitolo 2

2.1 Introduzione

Le moderne tecniche di ingegneria dei tessuti rappresentano ormai una soluzione ampiamente accettata nel trattamento di diverse condizioni patologiche dell'apparato muscolo-scheletrico, in particolare nel caso di lesioni traumatiche e tendinopatie da sovraccarico, in virtù della loro comprovata efficacia nel ripristinare la struttura e la funzione dei tessuti danneggiati. In questo capitolo viene trattato l'utilizzo di biomateriali, sia sintetici che naturali, impiegati per la fabbricazione di impalcature progettate, appunto, per il trattamento di lesioni tendinee o di difetti del tessuto osseo di diversa natura (Patrino *et al.*, 2014; Alaribe *et al.*, 2016).

Una specifica branca dell'ingegneria dei tessuti è rivolta, infatti, alla progettazione, alla realizzazione e alla validazione di impalcature, denominate *scaffolds*, al fine di migliorare i processi di rigenerazione tissutale, favorendo il ripristino delle fisiologiche condizioni morfo-funzionali (Alaribe *et al.*, 2016).

E' noto che i diversi tessuti di un organismo possiedono una certa capacità di auto-rigenerazione il cui successo, così come la tempistica, dipende, tuttavia, dal tipo e dal grado di lesione del tessuto stesso.

In questo contesto l'ingegneria dei tessuti, come anticipato, si serve di *scaffolds* fabbricati con biomateriali atti a rispondere a specifiche esigenze, prima tra tutte la biocompatibilità che li rende ben tollerati dall'organismo dell'ospite, consentendo a queste strutture di svolgere al meglio la loro funzione nell'indurre i diversi processi implicati nella rigenerazione tissutale. In molti casi, questi costrutti vengono funzionalizzati attraverso l'integrazione di molecole bioattive, quali fattori di crescita, che saranno poi rilasciate nel sito di impianto seguendo una modalità controllata nel tempo (Fu *et al.*, 2011).

Lo *scaffold* ideale, inoltre, presenta la caratteristica di essere atto a biodegradarsi man mano che il nuovo tessuto si sviluppa al suo interno

in modo tale che questo prenda, nel tempo, il posto dello stesso costruito (Kim *et al.*, 2015).

Nel corso degli anni, sono state sviluppate diverse tecniche di progettazione e fabbricazione di *scaffolds* che hanno portato a notevoli miglioramenti dal punto di vista dell'impatto clinico.

In primo luogo, un aspetto fondamentale è rappresentato dalla scelta dei biomateriali, che varia in funzione della tipologia del processo biologico che si mira a riprodurre (Leigh *et al.*, 2013).

2.2 I biomateriali

Secondo la *European Society for Biomaterials*, un biomateriale è definito come *un materiale destinato ad interfacciarsi con i sistemi biologici per sostituire un qualsiasi tessuto, organo o funzione dell'organismo* (Loh *et al.*, 2013). I biomateriali naturali, distinti solitamente in biomateriali naturali, a base di proteine o polisaccaridi, e biomateriali sintetici, differenziati in polimerici o ceramici, sono le due principali tipologie utilizzate per la fabbricazione di *scaffolds* per applicazioni biomediche (Malafaya *et al.*, 2007).

Attualmente, i costrutti costituiti da polimeri naturali che siano in grado di mimare le proprietà dei tessuti dell'organismo ospite che dovranno sostituire in seguito al danno, sono quelli maggiormente impiegati nel settore della medicina rigenerativa, in virtù anche della tempestiva risposta biologica che sono in grado di evocare rispetto agli *scaffolds* costituiti da materiali sintetici (Shi *et al.*, 2013). I biomateriali presenti in natura vengono, dunque, ottenuti da fonti naturali per poi essere sottoposti ad una serie di processi che consentono la fabbricazione del prodotto finale, ossia del costrutto ingegnerizzato (Lee *et al.*, 2014).

Biomateriali impiegati per la fabbricazione di <i>scaffolds</i>			
<i>Naturali</i>		<i>Sintetici</i>	
<i>Biomateriali a base di proteine</i>	<i>Biomateriali a base di polisaccaridi</i>	<i>Biomateriali polimerici</i>	<i>Biomateriali ceramici</i>
<ol style="list-style-type: none"> 1. Seta 2. Fibrina 3. Gelatina 4. Collagene 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Alginato 2. Acido ialuronico 3. Agarosio 4. Chitosano 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Poli-etilen glicole (PEG) 2. Poliglicolide (PGA) 3. Acido poli-lattico-co-glicolico (PLGA) 4. Poli-D, L-lactide (PLA) 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Ossido di alluminio 2. Ossido di zirconio 3. Fosfato di tricalcio α,β 4. Fosfato di tetracalcio 5. Idrossiapatite 6. Vetro bioattivo

Tabella 1: la tabella riporta diverse tipologie di biomateriali, distinti in sintetici e naturali.

I biomateriali naturali derivano dall'ambiente marino o terrestre e possono essere a base di proteine o polisaccaridi, diversamente, i biomateriali sintetici vengono distinti in polimerici e ceramici.

2.2.1 Biomateriali naturali

2.2.1 a Biomateriali naturali a base di proteine

I biomateriali più comunemente impiegati tra quelli a base di proteine sono la seta, il collagene e la fibrina. I costrutti fabbricati con questi materiali, oltre a fungere da sostegno per il tessuto in via di rigenerazione, vengono utilizzati principalmente per il differenziamento e il trapianto di cellule staminali (Kang *et al.*, 2011). In particolare, il collagene e la seta sono i biomateriali proteici più utilizzati nella fabbricazione di *scaffolds* per la rigenerazione dei tessuti ossei.

I costrutti in seta possono essere prodotti in forma diversa, dando vita a spugne, membrane, reti e film (Fig.9) (Kang *et al.*, 2016).

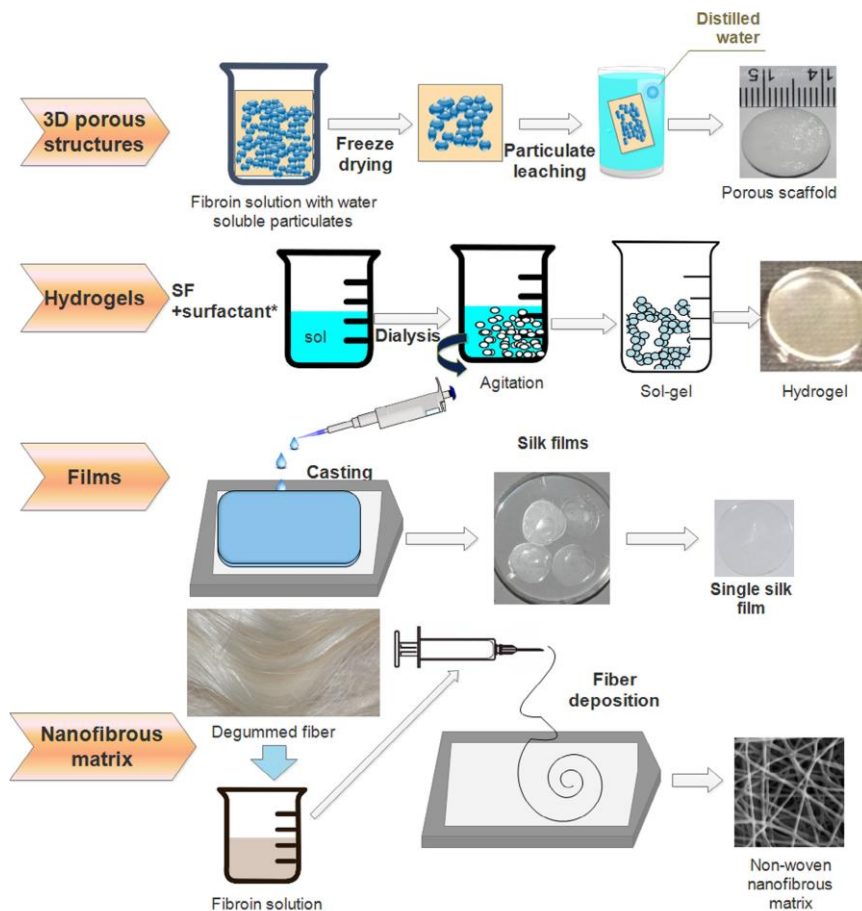


Figura 10: L'immagine illustra quattro diverse modalità di fabbricazione di *scaffolds* di seta. La prima strategia consiste nella creazione di costrutti porosi in 3D.

ed è basata sull' uso di un agente porogeno, l'NaCl. La tecnica consiste nel porre una soluzione di acqua distillata contenente seta e NaCl. In questo caso la porosità è data dalla dimensione dei cristalli di sale. Nel secondo caso lo *scaffold*, costituito da seta e fibrina, viene fabbricato attraverso l'utilizzo di agenti surfattanti in soluzione acquosa. Tali agenti si legano ai biomateriali formando una sorta di gel che diventa, appunto, un idrogelo, che assume la forma dello stampo in cui è stato inserito il gel di partenza. Nel terzo caso, la soluzione di seta viene depositata in uno stampo, portando alla formazione di un film sottile. Infine, la quarta strategia consiste nell'inserire la fibra *degommata* in una soluzione di fibrina mentre, successivamente e con l'ausilio di una siringa, la soluzione così composta viene depositata nell'apposito stampo (Bhattacharjee P. *et al*, Ac. Biom. 2017).

La seta è, inoltre, caratterizzata da tempi di degradazione lenti e proprietà meccaniche specifiche, che la rendono particolarmente adatta all' utilizzo nel campo della rigenerazione ossea.

Già in uno studio del 2010, Wu *et al.*, hanno impiegato costrutti di seta funzionalizzata con vetro bioattivo con microarchitetture porose volte a stimolare la rigenerazione ossea (Fig.10).

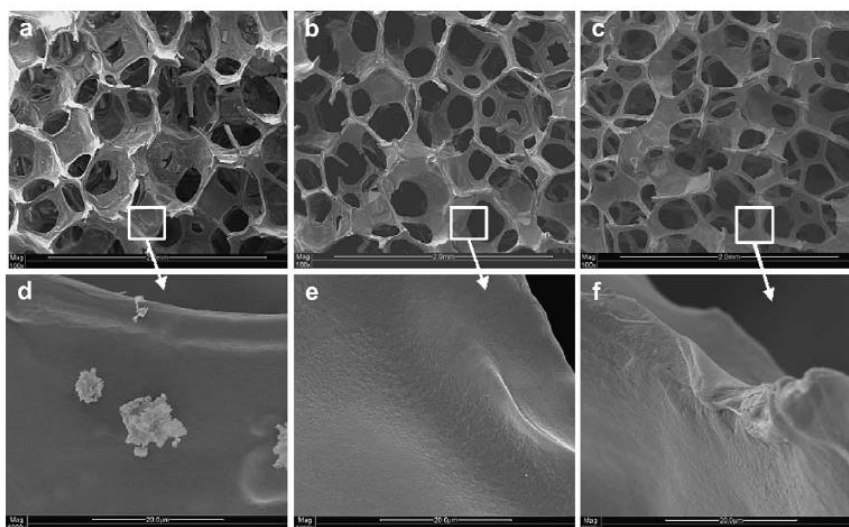


Figura 10: La figura mostra un'immagine acquisita al microscopio a scansione elettronica (SEM) di tre *scaffolds* di seta funzionalizzati con vetro bioattivo con diversa porosità. La maggiore porosità si evidenzia in a-d, a decrescere in b-e e, infine, in c-f (Wu C. *et al.*, Biom. 2010).

In ulteriori studi sono stati descritti *scaffolds* di seta seminati con cellule staminali mesenchimali (MSCs), tra questi spicca un lavoro di Ding *et al.* pubblicato nel 2017, che riporta l'efficacia di *scaffolds* di

seta cellularizzati con MSCs di ratto in relazione alla capacità di stimolazione dell'osteogenesi. In particolare, i costrutti si sono rivelati efficaci per il trattamento di un difetto cranico di dimensioni critiche (*critical-size bone defect model*) grazie al fatto che le cellule incluse all'interno dello *scaffold* presentavano una vitalità cellulare fino ad 8 settimane dall'impianto permettendo una rigenerazione ossea completa e funzionale, non ostacolata da alcun processo infiammatorio (Fig.11).

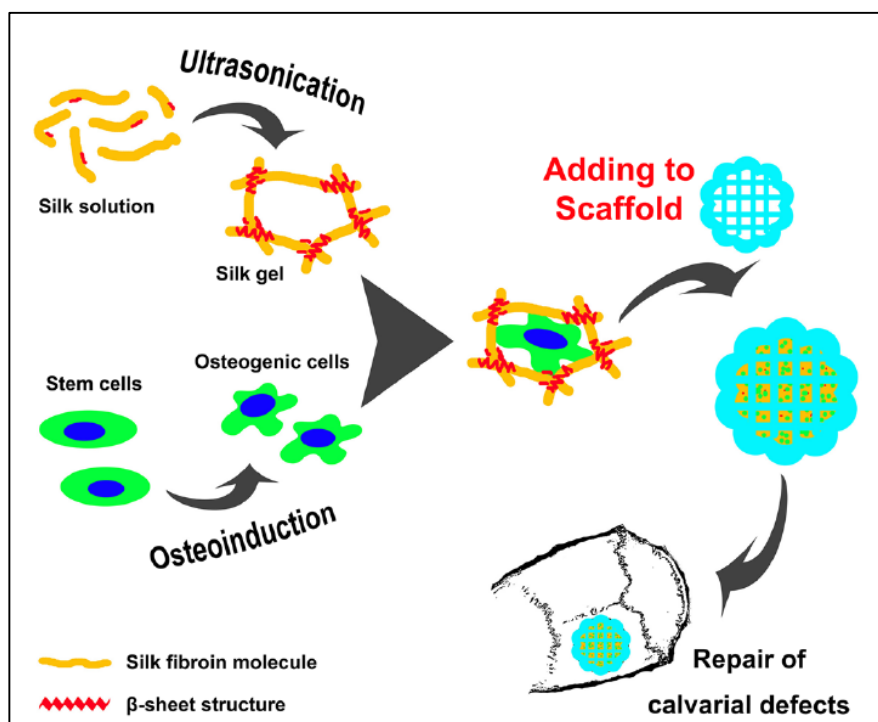


Figura 11: Illustrazione schematica del protocollo di fabbricazione dello *scaffold* impiegato da Ding *et al.* La soluzione di seta è stata sottoposta a trattamento con ultrasuoni per avviare la formazione della struttura a β -foglietto. Intanto la soluzione è stata miscelata con cellule osteogeniche e posta, goccia a goccia, sulla superficie di uno *scaffold* di seta.

Dopo gelificazione, lo *scaffold* seminato era pronto per l'impianto (Ding *et al.*, Sci. Rep. 2017).

Il collagene, diversamente, è noto per la capacità di fornire elasticità e sostegno ai diversi tessuti dell'organismo, in particolare alla pelle, ai vasi sanguigni, ai tendini, alla cartilagine e alle ossa. Tale sostanza, molto rappresentata all'interno dell'organismo, è una delle due principali componenti dell'osso, in quanto costituisce l'89% della

matrice organica, motivo per cui presenta un'elevata affinità per le cellule di tale tessuto (Di Maggio *et al.*, 2017).

I costrutti 3D costituiti da collagene sono utilizzati per molteplici applicazioni nel settore dell'ingegneria dei tessuti e possono presentare strutture anche molto diversificate (Fig.12).

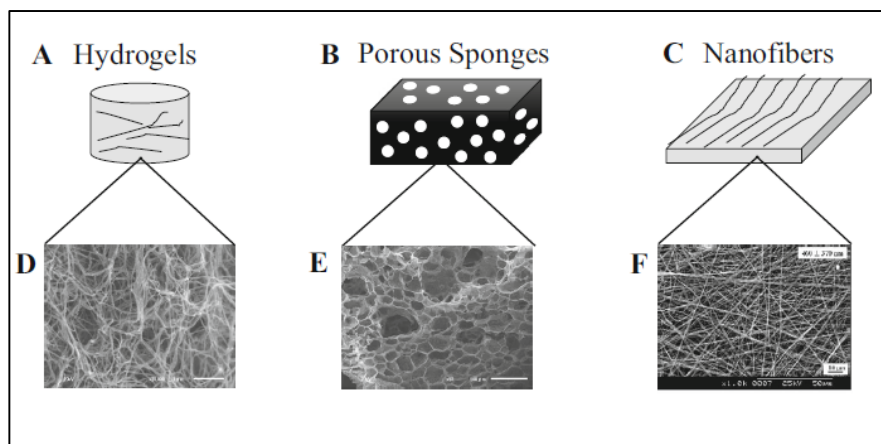


Figura 12: L'immagine riporta una rappresentazione sia macroscopica che microscopica di diverse strutture di *scaffolds* di collagene. In A e D è visibile un idrogel, in B ed E è visibile una spugna mentre in C ed F una struttura *scaffold* costituita da nanofibre (Irawan V. *et al.*, Rev. 2018).

Numerosi studi su organismi modello hanno, infatti, dimostrato che *scaffolds* di collagene reticolato inducono una risposta infiammatoria lieve testimoniata da una scarsa presenza di capsula fibrosa nella sede di impianto, a dimostrazione di un'elevata biocompatibilità (Wang *et al.*, 2009). L'importanza di questo dato deriva dal fatto che la mancanza di integrazione degli *scaffolds* con il tessuto circostante a partire dal quale dovrebbe essere innescata la rigenerazione tissutale, è una delle cause principali di fallimento dell'impianto.

La fibrina, invece, consiste in una sorta di rete di natura proteica fisiologicamente presente in numerosi tessuti viventi, quali per esempio il sangue, si ritrova precisamente nel plasma, che viene prodotta attraverso la polimerizzazione del fibrinogeno in caso di lesione dei vasi sanguigni. La fibrina, infatti, consente l'arresto dell'emorragia mediante la formazione di una maglia all'interno della quale vengono imbrigliati globuli rossi e globuli bianchi ma,

soprattutto, piastrine portando così alla formazione di un coagulo (Ahemed *et al.*, 2008).

I biomateriali a base di fibrina, oltre a presentare un buon livello di biodegradabilità, in virtù della caratteristica adesività di questa sostanza, presentano una notevole capacità di integrazione con i diversi tessuti biologici rispetto ai quali le tipiche fibre reticolari svolgono un'ottima funzione di supporto (Marx *et al.*, 2008).

In base al tipo di applicazione, uno *scaffold* di fibrina può essere fabbricato secondo tecniche diverse con diverse concentrazioni della proteina stessa, al variare delle quali varia anche l'effetto biologico (Ahemed *et al.*, 2008). In uno studio del 2020 condotto da Creste *et al.*, sono state utilizzate due tipologie di *scaffolds* di fibrina cellularizzati con MSC ed MSC differenziate in osteociti/condrociti per il trattamento di un difetto osseo di dimensioni critiche in un femore di ratto. Lo studio ha dimostrato che la formazione di osso si verificava in entrambi i casi già 21 giorni dopo l'impianto, a dimostrazione del fatto che la fibrina è un biomateriale in grado di incoraggiare la rigenerazione ossea, in particolare quando seminata con una componente cellulare adeguata.

Anche la fibronectina, ottenuta da plasma bovino o umano, essendo una proteina atta a legare collagene, fibrina ed eparina, favorisce il processo di guarigione delle ferite; per questo motivo può essere efficacemente integrata all'interno dei costrutti o utilizzata per funzionalizzarne la superficie (Fig.13) (Chen *et al.*, 2008).

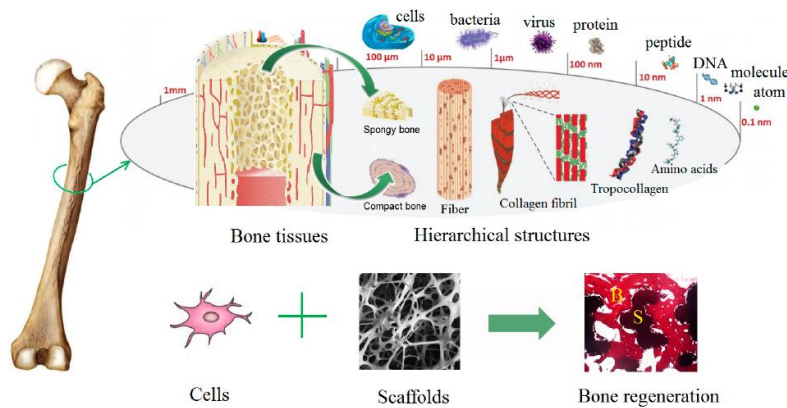


Figura 13: Nella figura sono illustrate la composizione e la struttura del tessuto osseo a partire dagli aspetti più macroscopici fino a quelli squisitamente

ultrastrutturali. In particolare, l'immagine evidenzia la struttura porosa dell'osso spongioso, caratterizzata da una rete di trabecole con porosità molto variabile, al fine di sottolineare il perché gli *scaffolds* disegnati per guidare la rigenerazione ossea devono necessariamente presentare una porosità di un certo tipo sia per forma che per dimensioni (Chen X. *et al.*, Nan. 2008).

2.2.1. b Biomateriali naturali a base di polisaccaridi

Esempi di biomateriali a base di polisaccaridi, macromolecole naturali dotate di notevole bioattività, sono l'acido ialuronico, l'alginato, l'agarosio e il chitosano, spesso utilizzati per la coltura e il differenziamento delle cellule staminali, in quanto in natura svolgono un ruolo fondamentale nel mantenimento della matrice extracellulare (ECM) (Chircov *et al.*, 2018).

Per questa ragione, nel caso in cui si rilevi da parte dell'organismo ospite una risposta immunitaria nei confronti di un costrutto costituito da una di queste molecole, è altamente probabile che questa sia stata innescata da sostanze contaminanti, quindi a seguito di una non totale purezza del materiale di partenza, o anche dal metodo impiegato per l'estrazione dello stesso biomateriale naturale (Saleha *et al.*, 2018).

L'acido ialuronico è un costituente altamente rappresentato in diversi tessuti dell'organismo, in particolare nella pelle, nella cartilagine e nel corpo vitreo; motivo per cui viene largamente utilizzato nel trattamento dell'osteoartrosi, in particolare del ginocchio, nel trapianto di cornea e nella chirurgia del glaucoma, oltre che per la rigenerazione del tessuto osseo (Kremer *et al.* 2000).

In un lavoro pubblicato nel 2018 da Mohammadi *et al.*, è stato sperimentato uno *scaffold* ibrido di collagene ed acido ialuronico volto a rilasciare gradualmente prednisolone, un glucocorticoide atto a ridurre i processi infiammatori cronici, come per esempio l'osteoartrite.

L'acido ialuronico è, inoltre, particolarmente indicato nel periodo post-operatorio in quanto esso è capace di indurre la guarigione dei tessuti prevenendo lo sviluppo di aderenze, problematica che può

verificarsi spesso a seguito di un intervento chirurgico (Chircov *et al.*, 2018).

L'agarosio, invece, è un polisaccaride isolato per la prima volta da alghe rosse che viene comunemente utilizzato come terreno per le colture cellulari sotto forma di agar. In ingegneria dei tessuti viene impiegato per produrre *scaffolds* votati a promuovere il differenziamento delle cellule staminali (Varoni *et al.*, 2012).

A supporto dell'adeguatezza dell'agarosio, nel 2012 uno studio di Varoni *et al.*, ha dimostrato che uno *scaffold* costituito da questo materiale, quando impiantato in un modello di tasca sottocutanea in un ratto, ha mostrato segni di integrazione ottimale dopo 16 settimane, insieme ad un grado di infiammazione minimo.

Il chitosano, infine, è un polisaccaride lineare derivato dalla deacetilazione parziale della chitina contenuta nell'esoscheletro di artropodi e crostacei e nelle pareti cellulari dei funghi. Tale materiale è stato ampiamente utilizzato come biomateriale per la rigenerazione ossea, della pelle e dei tessuti nervosi in forma di idrogeli, film, fibre o spugne (Roffi *et al.*, 2019).

Nel 2015, Ravanetti ed i suoi collaboratori, hanno valutato l'efficacia di *scaffolds* di chitosano arricchiti con raffiniosio per la terapia dei difetti osteocondrali in conigli. In particolare, dopo aver indotto un difetto osseo a livello femorale, gli autori hanno impiantato gli *scaffolds* per un periodo di 2 e 4 settimane.

Dopo 2 settimane, è stato osservato che la lesione conteneva tessuto granulomatoso, successivamente sostituito da una capsula fibrosa a 4 settimane confermando la mancata integrazione del chitosano con il tessuto circostante.

In un ulteriore studio, tuttavia, è stato dimostrato che cellule staminali mesenchimali di derivazione adiposa seminate all'interno di *scaffolds* di chitosano si aggregano per formare strutture ibride *in vitro*. In particolare, Huang e collaboratori, in uno studio pubblicato nel 2019, hanno riportato l'efficacia di uno *scaffold* di chitosano seminato con MSC derivanti da membrane sinoviali di coniglio, e bioattivato con il fattore di crescita trasformante beta (TGF- β), su lesioni condrali

indotte in un modello dello stesso animale, riscontrando una rigenerazione ossea funzionale già dopo 12 settimane.

2.2.3 Biomateriali sintetici

I biomateriali sintetici possono rappresentare una valida alternativa ai biomateriali naturali per la fabbricazione di *scaffolds* impiegati sia per la rigenerazione tissutale, quindi per applicazioni cliniche, sia per la coltura di cellule di varia natura, per applicazioni inerenti alla ricerca. Tali costrutti presentano diversi vantaggi tra cui la possibilità di essere riprodotti agevolmente grazie a composizioni chimiche ben definite. Questi materiali presentano, inoltre, proprietà meccaniche facilmente controllabili, così come il tasso di degradazione dopo l'impianto nel tessuto ospite. Tutto questo oltre alla possibilità di guidare il modellamento del tessuto neoformato in base all'architettura dello *scaffold* stesso, aspetto comune anche a diverse tipologie di costrutti realizzati a partire da materiali naturali (Alaribe *et al.* 2016).

2.2.3.a Polimeri sintetici

I polimeri sintetici sono spesso più economici di quelli naturali. Possono essere prodotti in grandi quantità e conservati per un lungo periodo in quanto, di solito, presentano tempi di degradazione molto lunghi (Arai *et al.*, 2011).

I polimeri sintetici più comunemente utilizzati nell'ingegneria dei tessuti sono gli acidi polilattici (PLA), il polietilenglicole (PEG), l'acido poli-lattico-co glicolico (PLGA) e il policaprolattone (PCL) (Saberianpour *et al.*, 2018).

Il PLGA è un copolimero costituito da monomeri di acido glicolico e acido lattico uniti da legami esteri.

Numerosi studi sono stati effettuati utilizzando *scaffolds* porosi fabbricati con diverse tecniche a partire da questi materiali.

In uno studio del 2008 Zhu e colleghi hanno valutato la biocompatibilità di uno *scaffold* spugnoso di PLGA, fabbricato con

una tecnica che prevedeva l'utilizzo della CO₂ per creare una spugna, su cellule di epatoma umano (Hep3B) mostrando che il costrutto supportava maggiormente i fenomeni di migrazione e proliferazione cellulare, nonché specifiche funzioni epatiche, rispetto ad uno *scaffold* prodotto con il metodo tradizionale che si avvale dell'utilizzo di un solvente.

Inoltre, in un lavoro del 2010 di Spiller *et al.*, è stato osservato che uno *scaffold* costituito da PLGA ed alcol polivinilico (PVA) favoriva l'adesione e la crescita cellulare di condrociti isolati dal femore di vitelli neonati.

Per quanto concerne, invece, il policaprolattone (PCL) si tratta di un poliesteri biodegradabile, biocompatibile, idrofobico e semicristallino che trova applicazioni importanti nell'ingegneria dei tessuti grazie al fatto che tende a degradarsi più lentamente di altri polimeri sintetici e, per questo motivo, può essere meglio sfruttato per ottenere il rilascio controllato di molecole bioattive nei tessuti bersaglio per un lungo periodo di tempo (Augustine *et al.*, 2017).

La sua scarsa bagnabilità di superficie determina una ridotta interazione con i fluidi biologici in virtù della sua idrofobicità, motivo per cui viene spesso funzionalizzato attraverso trattamenti di superficie o attraverso la commistione con altri polimeri allo scopo di migliorarne le caratteristiche di adesività (Sunga *et al.*, 2004).

2.2.3.b Ceramiche e vetri bioattivi

Le ceramiche bioattive, come l'idrossiapatite (HAP), il fosfato tricalcico (TCP), l'allumina, alcune composizioni di vetri di silicato e fosfato denominati vetri bioattivi e la vetroceramica sono in grado di rilasciare molecole all'interno del torrente circolatorio. Questi materiali tendono, inoltre, a formare legami stabili con i tessuti molli (Yan *et al.*, 2004).

In particolare, i vetri bioattivi sono considerati particolarmente adatti per la fabbricazione di *scaffolds* per la riparazione del tessuto osseo in quanto presentano la capacità non solo di favorire la proliferazione

delle cellule del tessuto osseo ma anche di legarsi fortemente ai tessuti sia duri che molli (Solanki et al., 2021). Nelle fasi successive all'impianto, i vetri bioattivi subiscono reazioni specifiche che portano alla formazione di fosfato di calcio amorfo (ACP) o idrossiapatite cristallina (HA) sulla superficie dello *scaffold*, processo che favorisce il loro legame con il tessuto circostante (Fu et al., 2010).

Nello stesso lavoro Fu e i suoi collaboratori hanno descritto l'efficacia di uno *scaffold* di vetro bioattivo seminato con *Bone Mesenchymal Stem Cells* (BMSC) isolate da femore di ratto. Il costrutto è stato impiantato in un modello di tasca sottocutanea nello stesso animale, dopo 4 settimane è stata evidenziata la formazione di tessuto vascolarizzato senza l'instaurarsi di processi infiammatori.

Molti dei materiali sintetici, tuttavia, mancano di siti per l'adesione cellulare il che determina la necessità di apportare ad essi modifiche che li rendano adeguati a consentire l'adesione e la proliferazione cellulare attraverso, per esempio, la generazione di gradienti di concentrazione di fattori di crescita (Fig.14) (Hua et al., 2021).

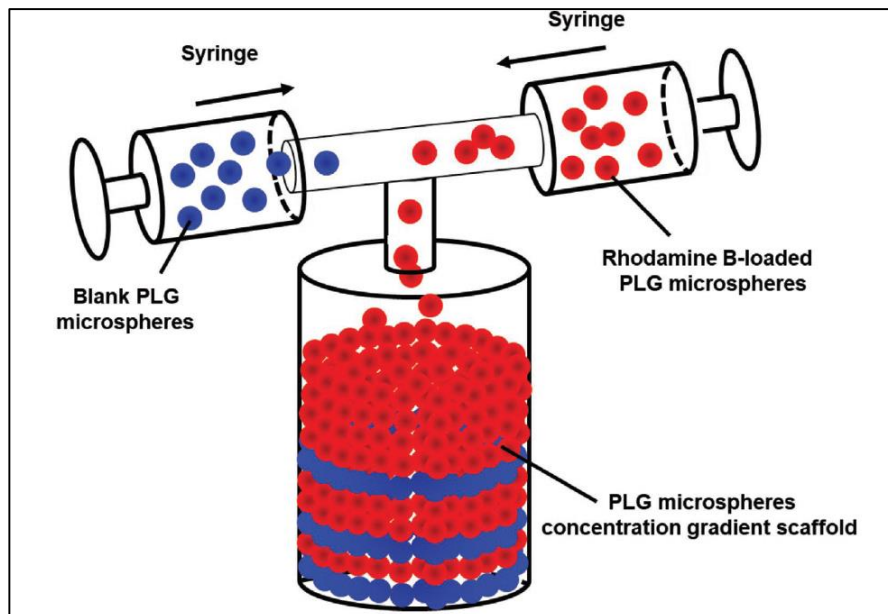


Figura 14: La figura illustra una modalità di generazione di un gradiente di concentrazione, in questo caso di rodamina utilizzata come molecola modello, all'interno di uno *scaffold* mediante l'utilizzo di microsfere contenenti molecole bioattive. In particolare, all'interno di un uno stampo cilindrico sono stati disposti,

con apposite siringhe, alcuni strati di microsfele di PLG scariche (in blu nell'immagine) ai quali sono stati interposti degli strati di microsfele di PLG caricate con rodamina. Lo sviluppo del gradiente, instauratosi in seguito alla degradazione delle microsfele, consentiva il passaggio della rodamina negli strati sottostanti (Hua *et al.*, Adv. Func. 2021).

2.3 Gradienti di concentrazione di fattori di crescita

Nell'ambito dell'ingegneria dei tessuti, i fattori di crescita svolgono un ruolo di primo piano nell'ambito di numerosi processi sia fisiologici che patologici (Yang *et al.*, 2015). Restando nell'ambito della stimolazione della riparazione del tessuto osseo, processo al quale il presente lavoro è rivolto in particolar modo, ricordiamo fattori di crescita osteo-induttivi, come il *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF), la *Bone Morphogenetic Protein* (BMP), l'*Insulin-like Growth Factor* (IGF), il *Transforming Growth Factor* (TGF- β), oltre al già ampiamente citato *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) (Oliveira *et al.*, 2020). Questi fattori, per quanto attraverso meccanismi diversificati, presentano tutti potenziali applicazioni volte a favorire l'osteogenesi e quindi la riparazione del tessuto osseo attraverso la regolazione del comportamento cellulare in termini di reclutamento, migrazione, adesione, proliferazione e differenziamento cellulare (Nie *et al.*, 2020).

Diversi studi su organismi modello hanno dimostrato che l'incorporazione di fattori di crescita in *scaffolds* costituiti da polimeri naturali come gelatina, chitosano, alginato, collagene e acido ialuronico determina un'accelerazione del processo di riparazione del tessuto osseo (Gupta *et al.*, 2014). All'interno delle diverse tipologie di *scaffolds* vengono inclusi specifici fattori di crescita volti ad agire su un determinato segmento di processo che si ritiene carente in un determinato contesto patologico.

A questo scopo, è necessario un rilascio controllabile e prolungato di fattori di crescita, sia per ridurre il rischio di potenziali reazioni infiammatorie che per permettere una guarigione adeguata della

lesione atta a consentire un ripristino funzionale del distretto anatomico sede del danno (Yoon *et al.*, 2002).

Diversi studi dimostrano che l'utilizzo di strutture *carrier* contenenti fattori bioattivi, può essere di grande beneficio nel guidare, nel tempo e nello spazio, la rigenerazione del tessuto in modo fisiologico (Hua *et al.*, 2020).

In un lavoro del 2015 pubblicato da Akar e collaboratori, viene provata l'efficacia, in un modello murino, di uno *scaffold* progettato per generare un gradiente di concentrazione di PDGF. Lo *scaffold* descritto presenta una porzione superficiale contenente microsfele di PLGA caricate con il fattore ed una zona sottostante in cui sono stati inseriti diversi strati di microsfele di polietilenglicole diacrilato (PEG) mentre tra i pori è stata versata una soluzione contenente fibrinogeno mescolato con il fluoroforo Alexa Fluor 647 (Fig.15).

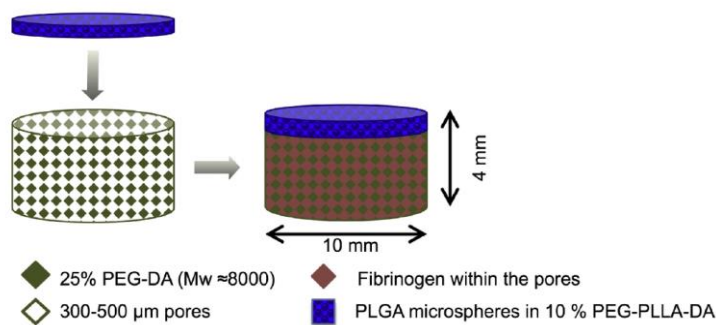


Figura 15: l'immagine mostra lo schema del processo di fabbricazione dello *scaffold* per la generazione del gradiente di PDGF. L'idrogel di PEG poroso contenente trombina è stato generato con il metodo del *salt leaching* mentre lo strato superiore di PEG-PLLA contenente microsfele di PLGA caricate con il fattore è stato posizionato sulla superficie dello *scaffold*. Successivamente, il fibrinogeno è stato "versato" sul costruito in modo che si posizionasse all'interno dei pori, sede in cui si è poi polimerizzato in fibrina reagendo con la trombina contenuta nel PEG (Akar *et al.*, Biom 2015).

Lo scopo del lavoro consisteva nel valutare la generazione del gradiente di concentrazione, quindi il movimento del fattore, in un arco di tempo di tre settimane dopo l'impianto, intervallo in cui, effettivamente è stata dimostrato un buon grado di penetrazione del tessuto all'interno dello *scaffold*.

Allo scopo di studiare gli effetti indotti dal rilascio di una determinata molecola bioattiva, l'ingegneria dei tessuti si avvale dell'utilizzo di dispositivi di microfluidica, una branca di questa disciplina che si basa sulla manipolazione di piccole quantità di fluidi, grazie all'impiego di micro-dispositivi caratterizzati da canali di dimensioni variabili da decine a centinaia di μm (Chung *et al.*, 2005).

La microfluidica sfrutta sia la sua caratteristica più evidente, le dimensioni ridotte, sia le caratteristiche legate al movimento dei fluidi all'interno dei micro-canali, come, per esempio, il flusso laminare. Infine, anche in questo caso, come già descritto per gli *scaffolds*, il sistema offre la possibilità di controllare le concentrazioni di molecole sia dal punto di vista della distribuzione spaziale che per quanto riguarda la somministrazione di queste nel corso del tempo.

Per questo motivo, sono stati studiati diversi dispositivi in grado di simulare determinate condizioni biologiche allo scopo di studiare specifici meccanismi molecolari.

In un interessante lavoro pubblicato da Chung *et al.* già nel 2005, viene descritto un dispositivo in PDMS all'interno del quale sono state seminate cellule staminali neurali delle quali è stato valutato il grado di differenziamento tramite osservazione al microscopio in *time-lapse* fino a 7 giorni di coltura. Il dispositivo era diviso in tre "camere gradiente": una camera in cui veniva introdotta una soluzione di fattori di crescita quali l'EGF, FGF2 e PDGF, ad una concentrazione minore, una camera centrale caricata con una concentrazione intermedia di soluzione contenenti i fattori ed una terza camera contenente la massima concentrazione degli stessi.

Un ulteriore lavoro di He *et al.*, pubblicato nel 2010 descrive la creazione di uno stampo in PDMS con un canalino di PEG. In tale canale è stata soffiata aria verso l'uscita del canale ed in uscita è stata soffiata aria verso l'ingresso del canale. In questo modo è stato generato un gradiente nell'area centrale del dispositivo. In entrata si è venuta a creare una zona successivamente trattata con un'alta concentrazione di Acido arginil-glicil-aspartico (RGD), sostanza che promuove l'adesione cellulare, la quale fungeva da controllo positivo.

Nell'area così trattata sono state seminate cellule endoteliali da cordone ombelicale umano per valutare gli effetti del gradiente, generatosi nella zona centrale nel corso del tempo, sia sull'adesione che sulla migrazione cellulare (Fig.16).

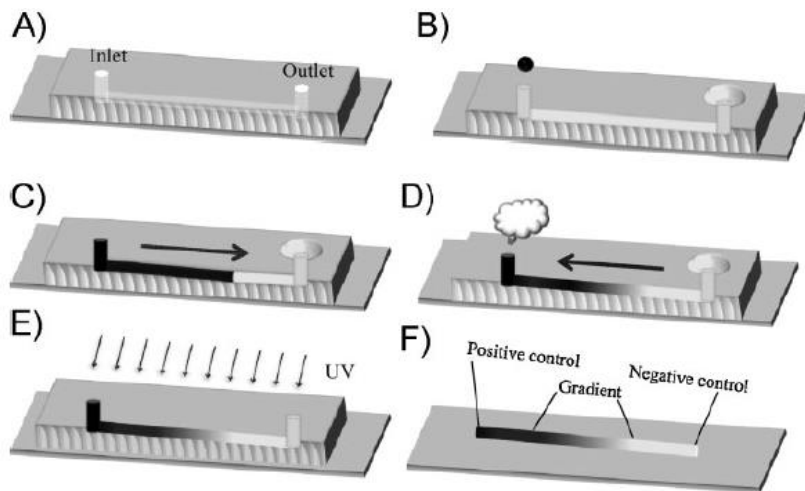


Figura 16: Diagramma schematico della generazione e successiva stabilizzazione di un gradiente mediante fotopolimerizzazione. In (A) è riportato il dispositivo costituito da uno stampo di PDMS con un canale centrale. In (B) Il canale è stato riempito con una soluzione contenente un'alta concentrazione di un precursore polietilenglicole diacrilato (PEG-DA) all'ingresso del canale (inlet) e con una soluzione contenente una bassa concentrazione del precursore all'uscita del canale (outlet). In (C) è descritto il passaggio di un flusso di aria immesso dall'ingresso verso l'uscita del canale mentre in (D) è riportato il passaggio in cui, al contrario, l'aria è stata immessa nel canale in senso opposto dall'uscita verso l'entrata. In questo modo nella zona centrale del canale è stato generato un gradiente, come riportato in (E), poi stabilizzato mediante fotopolimerizzazione. In (F) è, infatti, rappresentato il gradiente ottenuto grazie all'azione dei flussi d'aria in entrambe le direzioni.

In uno studio del 2014, pubblicato da Pagano e colleghi nell'ambito del nostro gruppo di ricerca invece, è stato creato un dispositivo formato da tre canali. Di questi il primo canale laterale è stato utilizzato per consentire la diffusione del mezzo di coltura contenente *Stromal cell derived factor 1* (SDF-1), in un canale centrale è stata posta una matrice in cui sono state seminate cellule staminali mesenchimali mentre in un secondo canale laterale è stata indotta la diffusione del mezzo di coltura privo del fattore di crescita. Questo

sistema, simile a quello da noi prodotto nell'ambito del presente lavoro di tesi, mira a stimolare le cellule attraverso la creazione di un gradiente di concentrazione lineare volto a favorire la migrazione cellulare e a studiarne i meccanismi che la regolano.

2.4. Ingegneria del tessuto osseo basata sull'utilizzo di cellule staminali mesenchimali

Come già riportato in precedenza, per favorire la rigenerazione ossea, così come la rigenerazione degli altri tessuti, è necessario stimolare adeguatamente sia la formazione di tessuto che, ancor prima, l'angiogenesi. Per questo motivo, molti studi suggeriscono l'uso di cellule staminali pluripotenti o multipotenti come fonti cellulari volte a migliorare i processi di rigenerazione ossea. A questo proposito, le cellule staminali pluripotenti, come le cellule staminali embrionali (ESC) e le cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC) possiedono un'elevata capacità di differenziamento in quanto sono in grado di differenziarsi anche in una linea osteogenica se stimolate adeguatamente.

In uno studio di Sawangmake e collaboratori cellule staminali derivate dal midollo osseo di cane, BM-MSC canine (cBM-MSC) sono state utilizzate grazie alla loro capacità di -proliferazione e differenziamento in diverse linee cellulari, quali quelle osteogenica, condrogenica e adipogenica.

La caratterizzazione immuno-fenotipica è stata svolta mediante citometria a flusso e ha mostrato che le cBM-MSC esprimono marcatori per tutte e tre le tipologie di linee cellulari citate (Sawangmake *et al.*, 2016).

Nell'ambito dello studio è stato, quindi, dimostrato che diversi fattori influenzano la capacità delle cBM-MSC di differenziarsi *in vitro* in cellule del tessuto osseo dopo aggiunta di β -glicerofosfato impiegato come fonte di fosfato inorganico necessario per la mineralizzazione. Una possibile applicazione di cBM-MSC nell'ingegneria del tessuto osseo è stata studiata in modelli di difetti ossei nel cane (Sample *et al.*,

2018). In particolare, sono stati trattati difetti segmentali delle ossa lunghe mediante l'utilizzo di fosfato tricalcico di idrossiapatite caricato con cBM-MSC. I risultati hanno mostrato che la formazione del callo osseo si è instaurata per tutta la lunghezza del difetto ad 8 settimane dal trapianto mentre la neoformazione di tessuto osseo all'interno dell'intero impianto è stata riportata 16 settimane dopo l'innesto (Arinzeh *et al.*, 2003).

Inoltre, in un lavoro di Yan e collaboratori pubblicato nel 2007 viene descritto il trapianto di cBM-MSC in un difetto osseo segmentale mandibolare in cani di 18 mesi. Tali cellule, inizialmente stimulate da fattori osteogenici e poi seminate su uno *scaffold* biodegradabile di β -fosfato tricalcico (β -TCP) hanno portato, a 32 settimane dall'impianto, all'integrazione completa dello *scaffold* con il tessuto dell'ospite.

Un'ulteriore applicazione di successo è stata dimostrata in un modello di difetto indotto della parete orbitale, sempre nel cane. In questo studio, condotto da Wang nel 2014, cBM-MSC autologhe sono state seminate su *scaffold* di β -TCP insieme ad un aspirato di midollo prelevato dall'osso (cBM). Dopo 24 settimane questa combinazione ha portato lo *scaffold* ad indurre la riparazione completa del difetto osseo.

Le AD-MSC canine (cAD-MSC), invece, sono state isolate e caratterizzate a partire dal tessuto adiposo. Anche queste cellule presentano la capacità di differenziarsi *in vitro* in cellule delle linee adiposa, cartilaginea e ossea (Creven *et al.*, 2014).

In particolare, è stato riportato che durante il trattamento osteogenico delle cAD-MSC *in vitro* con la *recombinant human bone morphogenic protein-2* (rhBMP-2), si riscontra un miglioramento dell'attività della fosfatasi alcalina (PA) e di conseguenza del grado di mineralizzazione del tessuto neoformato (Bearden *et al.*, 2017).

Inoltre, cAD-MSC isolate dal cuscinetto adiposo sottocutaneo inguinale di cani, dopo essere state indotte a differenziarsi verso la linea ossea e seminate su uno *scaffold* di corallo hanno portato ad una totale rigenerazione ossea dopo 24 settimane dall'impianto in un modello di difetto osseo cranico (Cui *et al.*, 2007).

2.5. Applicazioni dell'ingegneria dei tessuti alla medicina veterinaria

Le diverse tipologie di *scaffolds*, come già precedentemente riportato, svolgono il ruolo di promuovere l'adesione, l'integrazione, la proliferazione ed il differenziamento cellulare, nonché i processi di comunicazione tra le cellule finalizzati alla produzione di matrice extra-cellulare (ECM).

Molto spesso nel settore dell'ortopedia veterinaria i danni tissutali sono riconducibili a patologie croniche, per le questo motivo non sono disponibili per essi trattamenti particolarmente soddisfacenti. In questo contesto, grandi speranze sono riposte nella medicina rigenerativa che mira a sostituire o a rigenerare cellule, tessuti o organi per ripristinare o stabilire la normale funzione (Patrino et al., 2014).

Alcuni approcci terapeutici di medicina rigenerativa sono già entrati a far parte della pratica clinica nel caso degli equini con risultati promettenti, principalmente per il trattamento di lesioni tendinee, tendinopatie, lesioni della cartilagine e disturbi articolari degenerativi (Sample et al, 2017).

Nella pratica equina, diverse terapie rigenerative, come quelle basate sull'uso di cellule staminali mesenchimali (MSC), plasma ricco di piastrine (PRP), siero condizionato autologo (ACS) e soluzione proteica autologa (APS), sono entrate nell'uso clinico per varie applicazioni volte a curare patologie del sistema muscolo-scheletrico (Patrino et al., 2014).

Per sfruttare appieno il potenziale rigenerativo dei tessuti, è necessario comprendere come i processi riparativi sono mediati fisiologicamente e, soprattutto, come essi possano essere guidati per indurre la rigenerazione nei casi in questa non può avvenire se non a seguito di interventi terapeutici mirati. E' fondamentale ribadire che i meccanismi alla base del processo rigenerativo sono regolati dall'interazione che si viene a creare tra fattori di crescita, citochine, proteinasi e mediatori chimici cellulari combinati in diverse

concentrazioni al fine di agire sul livello di proliferazione cellulare, sulla composizione della matrice extra-cellulare e sulla resistenza alla risposta infiammatoria (Saleha et al., 2018).

Uno studio di Crovace *et al.*, pubblicato nel 2010 riporta che la somministrazione locale di MSC in un equino con un processo di tendinopatia in atto favorisce la rigenerazione del tessuto danneggiato. Un interessante studio da cui trarre spunto per la fabbricazione di uno *scaffold* cellularizzato usando cellule di interesse veterinario è stato pubblicato nel 2020 da De Angelis e collaboratori. In particolare, in questo studio sono stati prelevati condrociti dalle articolazioni metatarso-falangea e metacarpo-falangea di cavalli di differenti età e razze. Dopo diversi passaggi di coltura, da 0 ad 8, tali condrociti mostravano un de-differenziamento, ossia la trasformazione dallo stadio di cellule adulte a quello di cellule staminali, sia nel caso di cellule isolate da cavalli adulti che in quelle isolate da esemplari più giovani, aprendo un nuovo potenziale scenario per la fabbricazione di *scaffolds* da impiegare per il trattamento di difetti ossei nel campo della medicina veterinaria.

La complessa organizzazione strutturale della matrice extra-cellulare del menisco e il notevole carico biomeccanico a cui esso è esposto, costituiscono la principale sfida ancora aperta nell'ambito dell'ingegneria del tessuto meniscale. Gli impianti meniscali ad oggi disponibili, esclusivamente deputati all'applicazione nella clinica ortopedica umana, si basano sull'impiego di protesi sostitutive, di tessuti autologhi come il pericondrio o il tendine, di *scaffolds* naturali di fibrina, acido ialuronico e collagene o di materiali sintetici come PCL-uretano, teflon o poliuretano (Gupta et al., 2019).

Le diverse proprietà biomeccaniche di questi *scaffolds* rispetto al tessuto dell'ospite evidenziano la necessità di stimolare il reclutamento cellulare e la formazione di matrice extra-cellulare al fine di ottenere una struttura sufficientemente adeguata a dal punto di vista delle proprietà biomeccaniche. Un tentativo per poter affrontare queste sfide nell'ambito della medicina degli equini è stato effettuato nel 2017 da Kremer e colleghi, i quali hanno co-coltivato cellule

meniscali e cellule staminali mesenchimali all'interno di un idrogel di collagene di tipo I. Tuttavia, i risultati ottenuti non assicuravano un'adeguata resistenza biomeccanica per poter sostituire il tessuto del menisco nativo.

In un altro studio, pubblicato da Ferris *et al.* nel 2012, sezioni di menisco equino sono state ricomposte con colla di fibrina o colla di fibrina unita a cellule staminali mesenchimali equine isolate dal midollo osseo ed impiantate in un modello di tasca sottocutanea in topi nudi. Dopo l'espianto, i costrutti contenenti le cellule staminali hanno mostrato una vascolarizzazione significativamente aumentata con un livello di tessuto infiammatorio ridotto e un elevato grado di adesione al tessuto circostante rispetto al costrutto in cui è stata utilizzata la sola fibrina.

Sempre nell'ambito veterinario, invece, è stato riscontrato in un numero esiguo di lavori un particolare impiego di *scaffolds* di collagene per il trattamento di difetti articolari; nel cane tali costrutti vengono utilizzati per il trattamento di sindromi infiammatorie della membrana sinoviale allo scopo di prevenire rotture dei legamenti crociati. In un lavoro di Sample *et al.* pubblicato nel 2018, viene descritto l'utilizzo di uno *scaffold* di collagene caricato con un plasma ricco di piastrine (PRP), un concentrato di fattori di crescita di natura ematica, allo scopo di accelerare il processo di guarigione in un difetto di rottura parziale del crociato nel cane. Il processo è stato ritenuto completo dopo 12 mesi, nel corso dei quali non è stato mai riscontrato il rischio di una rottura totale, che spesso si verifica successivamente alla rottura parziale.

Recentemente, Diloksumpan ed i suoi collaboratori hanno fabbricato *scaffolds* di ceramica con diverse architetture interne, caratterizzate da un gradiente di porosità o da una distribuzione costante dei pori. Tali costrutti sono stati impiantati in difetti di dimensioni critiche a livello della tuberosità iliaca in cavalli di razza Criollo di età media intorno ai 7 anni, per valutare la capacità dei costrutti nel guidare la rigenerazione ossea (Fig.17).

Dal confronto tra gli *scaffolds* a porosità costante e gli *scaffolds* con gradiente di porosità è stato evidenziato che, dopo 7 mesi, il volume totale di osso neoformato ed il livello di degradazione dello *scaffold* erano significativamente maggiori nel caso dei costrutti con porosità costante. È interessante notare che gli *scaffolds* con gradiente di porosità mostravano un grado inferiore sia di rigenerazione che di rimodellamento anche in aree in cui la porosità era la medesima degli *scaffolds* a porosità costante.

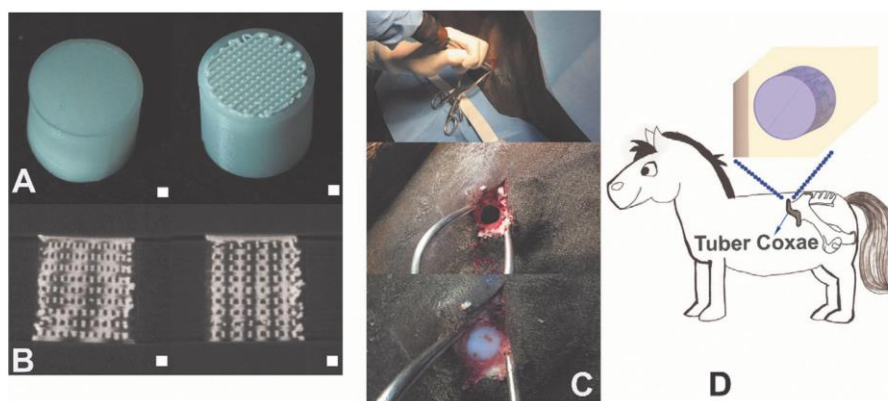


Figura 17: la figura mostra la procedura di impianto dello scaffold in un difetto osseo della tuberosità iliaca nel cavallo. In A) sono mostrate le due facce del costrutto rivestito da PCL, superiore (sinistra) e inferiore (destra). In B) sono mostrate delle immagini alla μ -TAC rappresentative dell'aspetto dei due *scaffolds* posti a confronto prima dell'impianto; In C) è rappresentata la sequenza dell'impianto degli *scaffold* a livello della tuberosità iliaca, inclusa la perforazione e l'esposizione del difetto, seguita dal posizionamento del costrutto. In D) è riportata in modo schematico la posizione dell'impianto.

2.5. Bibliografia

1. M. Patruno and T. Martinello, Treatments of the injured tendons in Veterinary Medicine: from scaffolds to adult stem cells, *Histol Histopathol* (2014) 29: 417-422
2. F. N. Alaribe, S. L. Manoto and S.C.K.M. Motaung, Scaffolds from biomaterials: advantages and limitations in bone and tissue engineering *Biologia* (2016) 71/4: 353-366
3. Q. Fu, E. Saiz, M.N. Rahaman, A.P. Tomsia Bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering: state of the art and future perspectives. *Mater. Sci. Eng.* (2011) 31: 1245–1256
4. I. G. Kim, M. P. Hwang, P. Du, J. Ko, C.W Ha, S.H. Do , K. Park Bioactive cell-derived matrices combined with polymer mesh scaffold for osteogenesis and bone healing *Biomaterials* (2015) 50 75-86
5. S. Leigh, H. Gilbert, I. Barker, J. Becker, S. Richardson, J. Hoyland, J. Covington and A. Dove Fabrication of 3-dimensional cellular constructs via microstereolithography using a simple, three-component, poly (ethylene glycol) acrylate-based system. *Biomacromolecules* (2013).14: 186–192
6. Q.L. Loh and C. Choong Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: role of porosity and pore size. *Tissue Eng.* (2013)19: 485–502
7. P.B. Malafaya, G.A. Silva and R.L. Reis Natural origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering application. *Adv. Drug Deliv. Rev.* (2007) 59: 207–233
8. P. Shi, S.A. Abbah, K. Saran, Y. Zhang, J. Li, H.K. Wong, et al. Silk fibroin-based complex particles with bioactive encrustation for bone

- morphogenetic protein 2 delivery. *Biomacromolecules* (2013) 14:4465-4474
9. J.S. Lee, S.D. Baek, J. Venkatesan, I. Bhatnagar, H.K. Chang, H.T. Kim, S.K. Kim, In vivo study of chitosan-natural nano hydroxyapatite scaffolds for bone tissue regeneration. *Int. J. Biol. Macromol* (2014), 67, 360–366
 10. Y. Kang, S. Kim, A. Khademhosseini, Y. Yang Creation of bony microenvironment with CaP and cell-derived ECM to enhance human bone-marrow MSC behavior and delivery of B MP-2. *Biomaterials* (2011); 32:6119-6130
 11. X. Ding, G. Yang, W. Zhang, G. Li, S. Lin, D. L. Kaplan and X. Jiang Increased stem cells delivered using a silk gel/scaffold complex for enhanced bone regeneration *Scientific Reports* (2017) 7: 2175
 12. P. Bhattacharjee, B. Kundu, D. Naskar, H.W. Kim, T. K. Maiti, D. Bhattacharya, S.C. Kundu Silk scaffolds in bone tissue engineering: An overview *Acta Biomaterialia* (2017) 63 1–17
 13. C. Wu, Y. Zhang, Y. Zhu, T. Friis, Y. Xiao Structure–property relationships of silk-modified mesoporous bioglass scaffolds *Biomaterials* (2010) 31 3429–3438
 14. N. Di Maggio, E. Martella, A. Frisantiene, T. J. Resink, S. Schreiner, E. Lucarelli, C. Jaquiere, D. J. Schaefer, I. Martin and A. Scherberich Extracellular matrix and $\alpha 5\beta 1$ integrin signaling control the maintenance of bone formation capacity by human adipose-derived stromal cells
 15. X. Wang, X. Wang, Y. Tan, B. Zhang, Z. Gu, X. Li, Synthesis and evaluation of collagen-chitosan-hydroxyapatite nanocomposites for bone grafting. *J. Biomed. Mater. Res.* (2009) Part A, 89, 1079–1087

16. V. Irawan, T.C. Sung, A. Higuchi, T. Ikoma Collagen Scaffolds in Cartilage Tissue Engineering and Relevant Approaches for Future Development *Tissue Eng Regen Med* (2018) 15(6):673–697
17. S. J. Sample, M. A. Racette, E. C. Hans, N. J. Volstad, S. L. Schaefer, J.A. Bleedorn, J. P. Little, K. R. Waller, Z. Hao, W. F. Block, P.Muir Use of a platelet-rich plasma-collagen scaffold as a bioenhanced repair treatment for management of partial cruciate ligament rupture in dogs *Plos One* (2018) 13 (6) 1-22
18. T.A.E. Ahemed, E.V. Dare, and M. Hincke, Fibrin: A Versatile Scaffold for Tissue Engineering Applications *Tissue Engineering* (2008) Part B 14, 199-215
19. G. Marx, X. Mou, A. Hotovely-Salomon, L. Levdansky, E. Gaberman, D. Belenky, and R. Gorodetsky Heat denaturation of fibrinogen to develop a biomedical matrix. *Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater* (2008) 84, 49
20. C.F. Zorzella Creste, P. R. Orsi, F.Cruz Landim-Alvarenga, L. A. Justulin , M. de A. Golim ,B. Barraviera and R. S. Ferreira Jr Highly Effective Fibrin Biopolymer Scaffold for Stem Cells Upgrading Bone Regeneration *Materials* (2020) , 13, 2747
21. X. Chen, H. Fan, X. Deng, L. Wu, T. Yi, L. Gu, C. Zhou, Y. Fan and X. Zhang Scaffold Structural Microenvironmental Cues to Guide Tissue Regeneration in Bone Tissue Applications *Nanomaterials* (2018), 8, 1-15
22. C. Chircov, A. M. Grumezescu, L. E. Bejenaru Hyaluronic acid-based scaffolds for tissue engineering *Rom J Morphol Embryol* 2018, 59(1):71–76

23. L.S. Saleha and S. J. Bryanta, The Host Response in Tissue Engineering: Crosstalk Between Immune cells and Cell-laden Scaffolds *Curr Opin Biomed Eng.* (2018) 6: 58–65
24. M. Kremer, E. Lang and A. C. Berger. Evaluation of dermal-epidermal skin equivalents ('composite-skin') of human keratinocytes in a collagen-glycosaminoglycan matrix (Integra TM Artificial Skin) *British Journal of Plastic Surgery* (2000), 53, 459-465
25. F. Mohammadi, S. Mohammadi Samani, N. Tanideh, F. Ahmadi Hybrid Scaffolds of Hyaluronic Acid and Collagen Loaded with Prednisolone: an Interesting System for Osteoarthritis *Adv Pharm Bull*, (2018), 8(1), 11-19
26. E. Varoni, M. Tschon, B. Palazzo, P. Nitti, L. Martini, L. Rimondini Agarose Gel as Biomaterial or Scaffold for Implantation Surgery: Characterization, Histological and Histomorphometric Study on Soft Tissue Response *Connective Tissue Research*, 2012; 53(6): 548–554
27. A. Roffi, E. Kon, F. Perdisa, M. Fini, A. Di Martino, A. Parrilli 5, F. Salamanna, M. Sandri, M. Sartori, S. Sprio, A. Tampieri, M. Marcacci and G. Filardo A Composite Chitosan-Reinforced Scaffold Fails to Provide Osteochondral Regeneration *Int. J. Mol. Sci.* (2019), 20, 2227
28. F. Ravanetti, C. Galli, E. Manfredi, A. M. Cantoni, E. Scarpa, G. M. Macaluso and A. Cacchioli Chitosan-based scaffold modified with D-(+) raffinose for cartilage repair: an in vivo study *Journal of Negative Results in BioMedicine* (2015) 14:2
29. H. Huang, X. Hu, X. Zhang, X. Duan, J. Zhang, X. Fu, L. Dai, L. Yuan, C. Zhou, and Y. Ao Codelivery of Synovium-Derived Mesenchymal Stem Cells and TGF- β by a Hybrid Scaffold for Cartilage Regeneration *Biomater. Sci. Eng.* (2019), 5, 805–816

30. K. Arai, S. Iwanaga, H. Toda, C. Genci, Y. Nishiyama and M. Nakamura
Three-dimensional inkjet biofabrication based on designed images.
Biofabrication (2011) 3: 034113.
31. S. Saberianpour, M. Heidarzadeh, M. Hossein Geranmayeh, H. Hosseinkhani, R. Rahbarghazi and M. Nouri
Tissue engineering strategies for the induction of angiogenesis using Biomaterials
Journal of Biological Engineering (2018) 12:36
32. X. Zhu, L. Lee, J. Jackson, Y. Tong and C. Wang
Characterization of porous poly (D, L-lactic-co-glycolic acid) sponges fabricated by supercritical CO₂ gas-foaming method as a scaffold for three-dimensional growth of Hep3B cells.
Biotechnol. Bioeng. (2008)100: 998–1009
33. K. L. Spiller, J.L. Holloway, M.E. Gribb and A. M. Lowman
Design of semi-degradable hydrogels based on poly(vinyl alcohol) and poly(lactic-co-glycolic acid) for cartilage tissue engineering
J Tissue Eng Regen Med (2011); 5: 636–647
34. R. Augustine, S. K.Nethi, N. Kalarikkal, DS Thomas and C. R. Patra
Electrospun polycaprolactone (PCL) scaffolds embedded with europium hydroxide nanorods (EHNs) with enhanced vascularization and cell proliferation for tissue engineering applications
J. Mater. Chem. B, (2017) 5, 4660-4672
35. HJ Sunga, C. Meredith, C. Johnson, Z. S. Galisa.
The effect of scaffold degradation rate on three-dimensional cell growth and angiogenesis
Biomaterials (2004) 25 5735–5742
36. X. Yan, C. Yu, X. Zhou, J. Tang and D. Zhao
Highly ordered mesoporous bioactive glasses with superior in vitro bone-forming bioactivities.
Angew. Chem. Int. Ed. Engl. (2004) 43: 5980–5984

37. A.K. Solanki, F. V. Lali, H. Autefage, S. Agarwal, A. Nommeots-Nomm, A.D. Metcalfe, M. M. Stevens and J. R. Jones Bioactive glasses and electrospun composites that release cobalt to stimulate the HIF pathway for wound healing applications *Biomaterials Research* (2021) 25:1
38. D. Hua, R. Xiong, K. Braeckmans, B. Scheid, C. Huang, F. Sauvage, and S. C. De Smedt Concentration Gradients in Material Sciences: Methods to Design and Biomedical Applications *Adv. Funct. Mater.* (2021), 2009005
39. N. J. Yang and M. J. Hinner Getting Across the Cell Membrane: An Overview for Small Molecules, Peptides, and Proteins *Methods Mol Biol.* 2015; 1266: 29–53
40. É. R. Oliveira, L. Nie, D. Podstawczyk, A. Allahbakhsh, J. Ratnayake, D. L. Brasil and A. Shavandi Advances in Growth Factor Delivery for Bone Tissue Engineering *Int. J. Mol. Sci.* (2021), 22, 903
41. L. Nie, Y. Deng, P. Li, R. Hou, A. Shavandi, S. Yang Hydroxyethyl Chitosan-Reinforced Polyvinyl Alcohol/Biphasic Calcium Phosphate Hydrogels for Bone Regeneration. *ACS Omega* (2020), 5, 10948–10957
42. A. Gupta, S. Bhat, P.R. Jagdale, B.P. Chaudhari, L. Lidgren, K.C. Gupta, A. Kumar, Evaluation of three-dimensional chitosan-agarose-gelatin cryogel scaffold for the repair of subchondral cartilage defects: An in vivo study in a rabbit model. *Tissue Eng. Part A* (2014), 20, 3101–3111
43. J. J. Yoon, J. H. Kim, T. G. Park Dexamethasone-releasing biodegradable polymer scaffolds fabricated by a gas-foaming/salt-leaching method *Biomaterials* (2003) 24 2323–2329
44. B. Akar, B. Jiang, S. I. Somo, A. A. Appel, J. C. Larson, K.M. Tichauer, E. M. Brey Biomaterials with persistent growth factor gradients in vivo accelerate vascularized tissue formation *Biomaterials* (2015) 72 61-73

45. B. G. Chung, L.A. Flanagan, S. W.Rhee, P. H. Schwartz, A.P. Lee, E. S. Monuki and N. L. Jeon Human neural stem cell growth and differentiation in a gradient-generating microfluidic device Lab on a chip (2005) 4
46. J.He, Y. Du, J.L. Villa-Uribe, C. Hwang, D. Li, and A. Khademhosseini Rapid Generation of Biologically Relevant Hydrogels Containing Long-Range Chemical Gradients Adv. Funct. Mater. (2010) 20, 131–137
47. G. Pagano, M. Ventre,¹ M. Iannone,F. Greco, P. L. Maffettone, and P. A. Netti Optimizing design and fabrication of microfluidic devices for cell cultures: An effective approach to control cell microenvironment in three dimensions Biomicrofluidics (2014) 8, 046503
48. A. Crovace, L. Lacitignola, G. Rossi and E. Francioso Histological and immunohistochemical evaluation of autologous cultured bone marrow mesenchymal stem cells and bone marrow mononucleated cells in collagenase-induced tendinitis of equine superficial digital flexor tendon. Vet Med Int. (2010) 250978
49. R. C. Gupta, R. Lall, A. Srivastava and A. Sinha Hyaluronic Acid: Molecular Mechanisms and Therapeutic Trajectory Frontiers in Veterinary Science (2019) 6-192
50. A. Kremer, I. Ribitsch, J. Reboredo, J. Dürr, M. Egerbacher, F. Jenner, H. Walles, Three-Dimensional Coculture of Meniscal Cells and Mesenchymal Stem Cells in Collagen Type I Hydrogel on a Small Intestinal Matrix-A Pilot Study Toward Equine Meniscus Tissue Engineering. Tissue Eng. Part A (2017), 23, 390–402
51. D. Ferris, D. Frisbie, J. Kisiday, C.W McIlwraith In vivo healing of Meniscal Lacerations Using Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells and Fibrin Glue. Stem Cells Int. (2012) 1–9
52. Nantavisai, S., Rodprasert, W., Pathanachai, K., Wikran, P., Kitcharoenthaworn, P., Smithiwong, S., Sawangmak, C., 2019. Simvastatin enhances proliferation and pluripotent gene expression by

- canine bone marrow-derived mesenchymal stem cells (cBM-MSCs) in vitro. *Heliyon* 5 (10), e02663
53. S. Nantavisai, W. Rodprasert, K. Pathanachai, P. Wikran, P. Kitcharoenthaworn, S. Smithiwong, C. Sawangmak, Simvastatin enhances proliferation and pluripotent gene expression by canine bone marrow-derived mesenchymal stem cells (cBM-MSCs) in vitro. *Heliyon* (2019)5 (10), e02663
 54. C. Sawangmake, S. Nantavisai, T. Osathanon, P. Pavasant,. Osteogenic differentiation potential of canine bone marrow-derived mesenchymal stem cells under different β -glycerophosphate concentrations in vitro. *Thai J. Vet. Med.* (2016) 46 (4), 617–625
 55. T.L. Arinzeh, S.J Peter, M.P. Archambault, C. van den Bos, S. Gordon, K. Kraus, S. Kadiyala, Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical sized canine segmental defect. *J Bone Joint Surg Am.* (2003) 85-a (10), 1927–1935
 56. J. Yuan, L. Cui, W.J. Zhang, W. Liu, Y. Cao Repair of canine mandibular bone defects with bone marrow stromal cells and porous beta-tricalcium phosphate. *Biomaterials* (2007) 28 (6), 1005–1013
 57. Y. Wang, X. Bi, H. Zhou, Y. Deng, J. Sun, C. Xiao, X. Fan Repair of orbital bone defects in canines using grafts of enriched autologous bone marrow stromal cells. *J Transl. Med.* (2014) 12 (1), 123
 58. R. Screven, E. Kenyon, M.J. Myers, H.F Yancy, M. Skasko, L. Boxer, M. Zhu Immunophenotype and gene expression profile of mesenchymal stem cells derived from canine adipose tissue and bone marrow. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2014 161 (1), 21–31.
 59. R.N. Bearden, S.S. Huggins, K.J. Cummings, R. Smith, C.A. Gregory, W.B. Saunders In-vitro characterization of canine multipotent stromal

- cells isolated from synovium, bone marrow, and adipose tissue: a donor-matched comparative study. *Stem Cell Res. Ther.* (2017) 8 (1), 218.
60. L. Cui, B. Liu, G. Liu, W. Zhang, L. Cen, J. Sun, Y. Cao Repair of cranial bone defects with adipose derived stem cells and coral scaffold in a canine model. *Biomaterials* (2007) 28 (36), 5477–5486.
61. P. Diloksumpan, R. V. Bolanos, S. Cokelaere, B. Pouran, J. de Grauw, M. van Rijen, R. van Weeren, R. Levato and J. Malda Orthotopic Bone Regeneration within 3D Printed Bioceramic Scaffolds with Region-Dependent Porosity Gradients in an Equine Model *Adv. Healthcare Mater.* (2020), 9, 1901807
62. E. De Angelis, A. Cacchioli, F. Ravanetti, R. Bileti, V. Cavalli, P. Martelli, P. Borghetti Gene expression markers in horse articular chondrocytes: Chondrogenic differentiation in vitro depends on the proliferative potential and ageing. Implication for tissue engineering of cartilage *Research in Veterinary Science* (2020) 128 107–117.

Capitolo 3

3.1. Scopo del lavoro

La rigenerazione tissutale è un processo complesso che si svolge attraverso il susseguirsi di una serie di eventi innescati dall'attivazione a cascata di altrettanti meccanismi molecolari. La rapidità del processo di rigenerazione è molto variabile, in dipendenza del grado della lesione, del distretto anatomico in cui si instaura, delle condizioni generali dell'organismo, della concomitanza o meno di un intervento terapeutico e, nel caso in cui questo sussista, della sua tempestività e adeguatezza. Alla luce di tutti questi aspetti, risulta chiaro che non è possibile prevedere aprioristicamente la durata del processo atto a determinare la completa guarigione del danno tissutale, processo la cui durata può, quindi, variare da ore, per lesioni lievi, a giorni fino a mesi per lesioni di notevole entità.

Al fine di riprodurre o, quanto meno, innescare secondo una corretta cinetica i meccanismi fisiologici responsabili della riparazione, l'ingegneria dei tessuti si serve di "piattaforme" in grado di rilasciare, in maniera modulata nel tempo, specifiche biomolecole atte a guidare lo svolgimento di quei determinati eventi che assicureranno un'adeguata riparazione tissutale (Rossi et al., 2016; Salerno et al 2010).

Questo progetto di dottorato nasce nell'ambito di un ampio programma di ricerca denominato *CASCADE* sviluppato presso il *Center for Advanced Biomaterials for Health Care/CRIB* di Napoli, un centro satellite dell'Istituto Italiano di Tecnologia di Genova. Lo scopo del progetto descritto in questo lavoro di tesi è consistito nel guidare, attraverso la valutazione dell'interazione dei costrutti con sistemi biologici *in vitro* e *in vivo*, la fabbricazione di uno *scaffold* in grado di modulare il processo angiogenico e quindi la rigenerazione tissutale secondo una modalità controllata nello spazio e nel tempo.

Per raggiungere questo obiettivo si è proceduto a disegnare e a realizzare *scaffolds* bioattivi, ossia matrici contenenti molecole coinvolte fisiologicamente in determinati processi biologici. Si è

trattato, naturalmente, di uno studio multidisciplinare che ha visto impegnate figure professionali diverse, ciascuna coinvolta per gli aspetti di propria competenza che hanno interagito quotidianamente per il raggiungimento di uno scopo comune. La multidisciplinarietà del gruppo di lavoro mi ha consentito di applicare le mie conoscenze nell'ambito della biologia e della fisiologia per gli studi coinvolgenti cellule e animali e nell'apprendere ulteriori approcci e metodiche molto diversi che ho, invece, impiegato per la fabbricazione di *scaffolds* e dispositivi di microfluidica.

I biomateriali utilizzati per la fabbricazione dei costrutti sono stati il policaprolattone e l'acido poli (lattico – co – glicolico), già testati in studi preclinici dallo stesso gruppo di ricerca all'interno del quale ho svolto la mia attività. Tali polimeri, prodotti ed assemblati attraverso l'impiego di tecniche diverse hanno prodotto costrutti con diverse caratteristiche strutturali. In particolare, l'approccio utilizzato si è basato sulla creazione di microelementi, denominato *building blocks*, che, una volta assemblati, hanno portato alla creazione di *scaffolds* modulari.

L'innovazione, in termini di architettura e bioattività di questi costrutti risiede nel fatto che essi sono caratterizzati da una porosità controllata e da una funzionalizzazione basata sull'inserimento *ad hoc* di micromoduli atti a rilasciare in maniera controllata molecole bioattive, nel caso specifico il fattore di crescita vascolare, in modo da generare un gradiente di concentrazione atto a guidare la formazione di nuovi vasi sanguigni, evento che costituisce il *primum movens* di ogni processo di rigenerazione.

La prima struttura testata presentava una porosità non controllata, il processo di fabbricazione impiegato era, infatti, basato su una tecnica in cui il diametro dei pori è dipendente dalla dimensione dei cristalli di sale usati durante la lavorazione del costrutto.

La seconda struttura, invece, presentava una porosità controllata ed era costituita da diversi strati assemblati in maniera ordinata.

Infine, la terza struttura prodotta e testata era caratterizzata da un'architettura progettata per includere, in una posizione prestabilita, le microparticelle deposito contenenti il fattore di crescita vascolare. Il primo obiettivo è stato quello di confermare la biocompatibilità di questi *scaffolds* dimostrando un'adeguata interazione tra il costruito e i sistemi cellulari mentre, successivamente, si è proceduto a valutare l'adeguatezza del costruito in uno studio preclinico su modello murino, ponendo, in particolare, l'attenzione sul potenziale vasculogenico e sul grado di integrazione dello *scaffold* con il tessuto dell'ospite. La fase finale, che si prevede di svolgere a breve sarà rivolta a studiare l'efficacia del costruito nell'indurre la rigenerazione del tessuto osseo in un modello di difetto cranico di dimensioni critiche (*critical-sized calvarial defect model*).

Fisiologicamente i processi biologici sono mediati da una serie di vie di segnalazione la cui funzione essenziale rientra in una specifica sequenza di eventi. Come già accennato in precedenza, approcci innovativi nell'ambito dell'ingegneria dei tessuti sono quelli che mirano a guidare il processo di rigenerazione tissutale attraverso la generazione di gradienti biochimici.

In questo contesto, l'obiettivo finale del progetto consiste nella creazione di uno *scaffold* in grado di rilasciare diverse concentrazioni di fattore di crescita vascolare da aree diverse dello stesso costruito, per consentire il reclutamento delle cellule endoteliali ed innescare un processo angiogenico controllato che segua la scia tracciata dalle microparticelle deposito. Per questo motivo, tali microparticelle devono essere disposte in modo da contenere concentrazioni di fattore più elevate all'esterno del costruito, in modo da poter indurre l'effetto biologico, e concentrazioni inferiori all'interno, allo scopo di stabilizzare i vasi neoformati all'interno dello *scaffold* stesso.

È stata, quindi, valutata, in primo luogo, l'efficienza di incapsulamento del fattore di crescita vascolare in microparticelle deposito di forma sferica e, una volta individuata la concentrazione ottimale da incapsulare attraverso dei saggi su Matrigel, sono stati effettuati ulteriori saggi di angiogenesi al fine di misurare la quantità

di fattore realmente incapsulato all'interno delle microparticelle. La valutazione è stata effettuata osservando e quantificando l'effetto biologico che il mezzo contenente le microparticelle degradate, denominato appunto "degradato", ha esercitato sulle cellule endoteliali.

Successivamente, è stato effettuato uno studio basato sull'utilizzo di un dispositivo di microfluidica. Nel caso specifico del presente progetto l'impiego di un dispositivo di microfluidica è stato mirato a riprodurre le sollecitazioni meccaniche e biochimiche del flusso sanguigno sulle cellule endoteliali.

A questo scopo, si è proceduto a micro-fabbricare un dispositivo attraverso l'uso di un software di grafica, Autocad, e, successivamente, di un software atto a convertire il disegno in coordinate spaziali (X, Y e Z) che, inviate ad un'apposita apparecchiatura, denominata *micro-milling* (μ -*milling*), consentono la fabbricazione del micro-dispositivo desiderato. La μ -*milling* agisce attraverso l'impiego di un'apposita punta, in modo da riprodurre su un materiale plastico, di solito il poli-metil-metacrilato (PMMA), uno stampo in cui viene colato un ulteriore materiale allo stadio liquido che andrà a costituire il dispositivo. Nel nostro caso questo ultimo materiale è stato il Polidimetilsilossano (PDMS) per la sua capacità di dare vita ad uno stampo rigido e quindi al nostro dispositivo (Figura 1).

Il dispositivo è stato disegnato per consentire lo studio di un gradiente di concentrazione del fattore di crescita vascolare all'interno di una matrice di collagene. Lo scopo era ottenere una serie di informazioni, in forma di profilo di diffusione del fattore all'interno della matrice prescelta, relative agli effetti biologici del gradiente di concentrazione del fattore su cellule endoteliali.

Il prossimo passo sarà la fabbricazione degli *scaffolds* funzionalizzati con microparticelle deposito adeguatamente caricate con il fattore a seguito delle informazioni raccolte nel corso dello studio di microfluidica. L'efficacia dei costrutti sarà quindi testata, come già

accennato, in un modello murino di difetto cranico di dimensioni critiche.

3.2. Bibliografia

1. L. Rossi, C. Attanasio, E. Vilardi, M. De Gregorio, P.A. Netti Vasculogenic potential evaluation of bottom-up, PCL scaffolds guiding early angiogenesis in tissue regeneration. *J Mater Sci mater Med* (2016);27 - 6:107
1. A. Salerno, D. Guarnieri, M. Iannone, S. Zeppetelli, P.A. Netti Effect of Micro-and Macroporosity of Bone Tissue Three-Dimensional-Poly (ϵ -Caprolactone) Scaffold on Human Mesenchymal Stem Cells Invasion, Proliferation, and Differentiation, *Tissue Engineering* (2010) Part A 16 (8), 26

Capitolo 4

4. Materiali e metodi

4.1. Fabbricazione di *scaffolds* polimerici

4.1.1. *Scaffolds* fabbricati con la tecnica di *salt leaching*

Gli *scaffolds* fabbricati con la tecnica di *salt leaching* presentavano una struttura random con pori di diametro medio finale di 450-500 μm . La tecnica consta di più fasi. La prima fase consiste nel preparare una soluzione polimerica con diclorometano (DCM) ed il 10 % di policaprolattone (PCL), più precisamente 10 g di PCL sono stati diluiti in 100 ml di DCM.

La soluzione di PCL/DCM è stata miscelata con cloruro di sodio (NaCl) in rapporto 1:1 al fine di ottenere un materiale di consistenza pastosa.

Questa pasta è stata successivamente posta, con l'ausilio di una spatola, in stampi di Teflon dello spessore di 2 mm con fori di diametro di 5,5 mm.

Lo stampo con gli *scaffolds* così formati è stato lasciato sotto cappa chimica *overnight* (o/n) a temperatura ambiente (t.a.) per permettere l'evaporazione del DCM. Al termine del processo i costrutti misuravano 5 mm di diametro e 1.5 mm di spessore (Fig. 18).

Il giorno successivo, i campioni così fabbricati sono stati sottoposti a lavaggi ripetuti in acqua MilliQ per 24 h ed asciugati a t.a. Questo procedimento ha consentito la formazione di pori di diametro dipendente dalla dimensione dei cristalli di sale venutisi a formare.

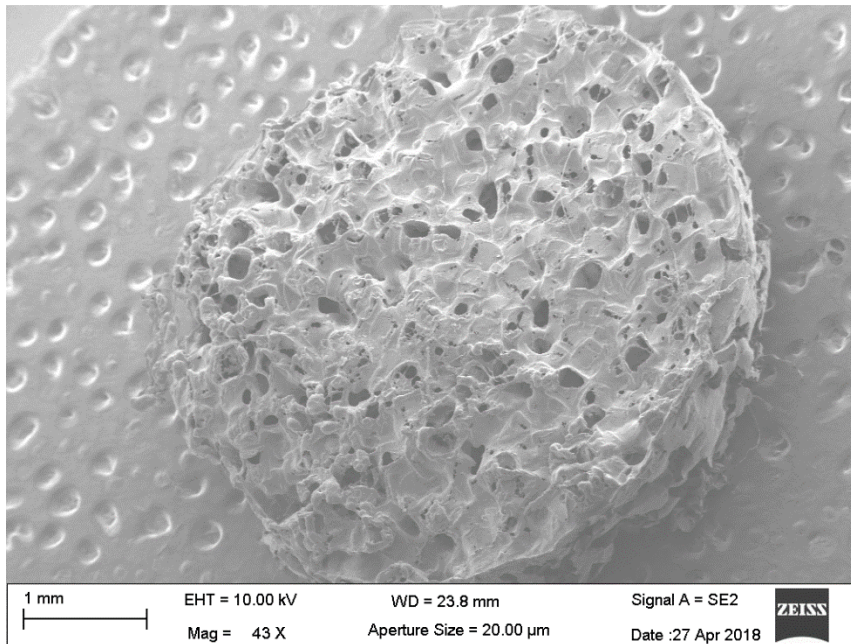


Figura 18: L'immagine mostra un'acquisizione al SEM dello *scaffold* fabbricato con la tecnica di *salt leaching* (Scale bar 1 mm).

4.1.2. *Scaffolds* fabbricati con la tecnica della sinterizzazione termica

Attraverso la tecnica della sinterizzazione termica sono stati prodotti *scaffolds* con una struttura ordinata. I costrutti sono stati fabbricati a partire da unità di base, *building blocks*, costituite da microsfere di PCL con un diametro di 425-500 μm . Le microsfere sono state inizialmente assemblate in un monostrato mentre a seguire, più strati sono stati disposti uno sull'altro ottenendo, così, una struttura cubica con uno spessore di 1,5 mm e un lato di 5,5 mm.

Anche questa tecnica è costituita da diverse fasi. Il primo passo è consistito nella fabbricazione delle microsfere di PCL con la tecnica della singola emulsione olio/acqua a partire da una soluzione di PCL (10 % w/v) in DCM.

A seguire è stata preparata una soluzione di alcool polivinilico (PVA) ad una concentrazione di 0.5 % con 100 μl di Tween 20 in acqua MilliQ. Tale soluzione è stata poi posta in agitazione ad una temperatura di 100 $^{\circ}\text{C}$ in modo da sciogliere completamente il PVA e ridurre la possibilità di formazione di aggregati.

La soluzione di PCL/DCM è stata aggiunta goccia a goccia alla soluzione di PVA e posta in agitazione per 3 ore a 500 rpm.

Le microsfere così ottenute sono state assemblate in uno stampo di PDMS mediante un processo definito di “sinterizzazione termica” che, attraverso lo scioglimento parziale dello strato superficiale del polimero costituente le microsfere stesse, porta alla formazione di colletti di fusione tra esse. Sono state versate sulla struttura delle gocce di etanolo, per consentire un perfetto allineamento delle singole microsfere nello stampo, in quanto è stato osservato sperimentalmente in questo specifico caso, che l’etanolo annulla la carica elettrostatica delle microsfere di PCL che hanno dimensioni dell’ordine di micrometri consentendone, appunto, l’allineamento. A seguire, lo stampo contenente le microsfere allineate è stato mantenuto in stufa per 4 minuti a 90 °C.

In questo modo è stata creata una struttura unica formata da microsfere unite a formare un monostrato.

Per la fabbricazione di una struttura tridimensionale ordinata, più monostrati di microsfere sono stati disposti in uno stampo di Polidimetilsilossano (PDMS). Successivamente, per ottenere lo sviluppo di colletti tra uno strato e l’altro, la cameretta è stata mantenuta in stufa per 5 minuti a 70 °C. A seguire i campioni sono stati lasciati sotto cappa chimica *o/n* per la fase di raffreddamento (Fig.19).

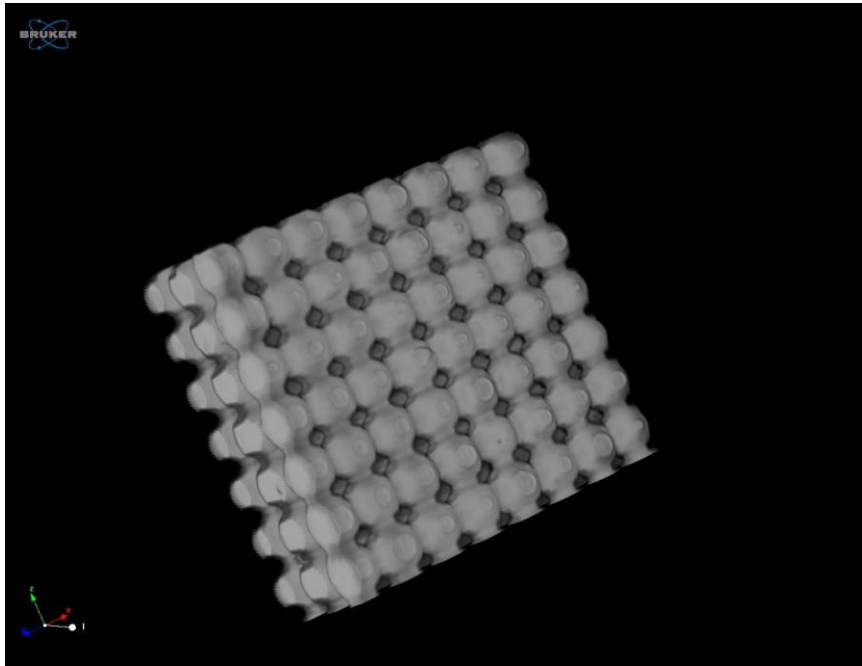


Figura 19: l'immagine mostra una ricostruzione alla microTAC di uno scaffold costituito da tre strati di microsferi sinterizzate fusi tra loro. All'osservazione risultano molto evidenti i colletti di fusione tra le microsferi.

4.1.3. Scaffolds fabbricati con la tecnica di *replica molding*

Gli *scaffolds* fabbricati secondo la tecnica di *replica molding* presentavano una struttura ordinata con uno spessore di 1,5 mm ed il lato di 5,5 mm.

Anche questa tecnica prevede più fasi. La prima fase è consistita nella creazione di uno stampo in PDMS in cui sono state disegnate le strutture dei singoli monostrati (Fig. 20).

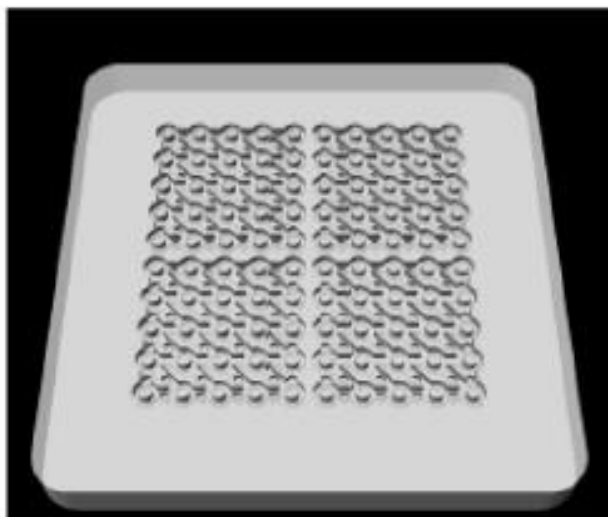


Figura 20: l'immagine mostra la cameretta di PDMS in cui è stata colata la soluzione di polimero per la creazione dei singoli monostrati. Questi sono stati successivamente assemblati attraverso l'incastro di pilastri all'interno di appositi spazi, come mostrato in figura 21 (Cesarelli G. PhD thesis)

A differenza delle strutture precedentemente descritte quelle ottenute mediante l'impiego di questa metodica presentano un'architettura avente una superficie piatta, con uno strato superiore, uno intermedio ed uno inferiore. Gli strati inferiore e superiore presentano le stesse caratteristiche strutturali con fessure di $250\ \mu\text{m}$ mentre lo strato intermedio è caratterizzato dalla presenza di dei fori del diametro di $500\ \mu\text{m}$.

Tra i tre strati sono state interposte delle strutture cilindriche, definite *pillars*, con la funzione di consentire l'incastro dei monostrati tra loro. In questo modo sono state ottenute strutture caratterizzate da una porosità laterale, conferita dall'altezza dei *pillars*, pari a $250\ \mu\text{m}$ (Fig. 21).

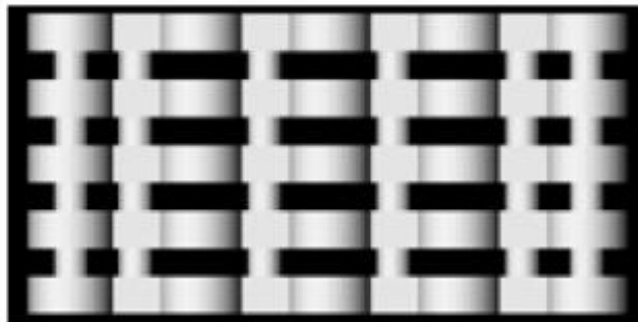


Figura 21: l'immagine mostra uno *scaffold* prodotto con la tecnica *replica molding* osservato lateralmente. Sono evidenti i pori che si presentano in forma di fessure di altezza coincidente con la parte dei *pillars* che fuoriesce dalle sedi di incastro.

È stata preparata una soluzione di DCM/anisolo in proporzione 70%/30% a cui è stato aggiunto PCL al 30%. Successivamente, la soluzione è stata colata nello stampo di PDMS che è stato poi posizionato su una piastra riscaldata a 50°C *o/n*.

Dopo aver asportato i monostrati dallo stampo di PDMS, questi sono stati disposti in maniera ordinata in una cameretta di Teflon posizionata su una piastra riscaldata a 39 °C per 10 minuti. Successivamente sui monostrati è stata versata una piccolissima quantità di DCM allo scopo di permettere la formazione dei colletti tra uno strato e l'altro e quindi l'assemblaggio del costruito finale (Fig. 22).

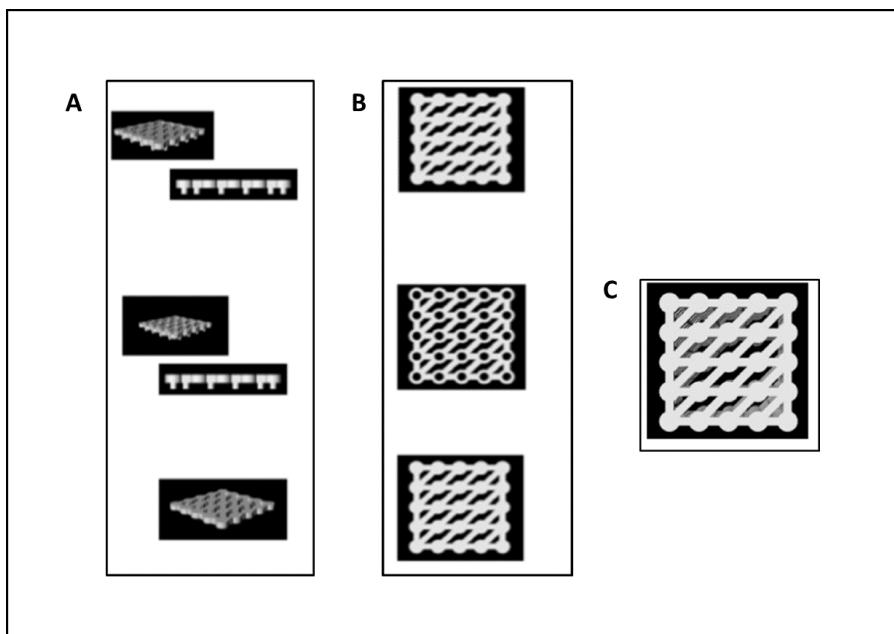


Figura 22: l' immagine mostra in a) la riproduzione laterale dei tre monostrati; in alto si osserva lo strato superiore, a seguire lo strato intermedio, deputato ad ospitare le microsparticelle di PLGA e, in basso, lo strato inferiore. In b) è raffigurata la riproduzione frontale dei tre singoli monostrati mentre in c) si può osservare la riproduzione frontale dello scaffold completo. *Scale bar* 1 mm (Cesarelli G. PhD thesis).

4.1.4 Fabbricazione di microsparticelle di PLGA caricate con VEGF

Nell'ambito del processo di preparazione delle microsparticelle (μ Ps) di acido poli(lattico-co-glicolico) caricate con il fattore di crescita vascolare (VEGF) la fase di maggiore rilievo è consistita nella procedura di emulsione acqua-olio-acqua.

Le soluzioni di base sono state costituite come segue:

1. soluzione sterile di VEGF alla concentrazione di 1 mg/ml in PBS 1X con lo 0.2% di albumina sierica bovina o BSA (A-7030, Sigma-Aldrich, USA);
2. soluzione di PVA ad una concentrazione di 0.5 %
3. soluzione di BSA alla concentrazione di 0.97% p/V
4. soluzione di sale sodico di eparina (H3149, Sigma-Aldrich, USA) alla concentrazione di 0.1%

5. soluzione in DCM di PLGA al 15 %.

La soluzione di VEGF/BSA è stata dispensata goccia a goccia nella soluzione di DCM/PLGA, procedendo con la prima emulsione a 15000 rpm per 2 minuti. Successivamente i prodotti della singola emulsione sono stati aggiunti nella soluzione di PVA, procedendo immediatamente alla seconda emulsione a 8000 rpm per 1 minuto.

Le microparticelle sono state lasciate sotto cappa chimica a temperatura ambiente per tre ore per permettere l'evaporazione del DCM e l'indurimento del PLGA.

4.2 Studio *in vitro*: interazione cellula-materiale

4.2.1. Studio su *scaffolds* ottenuti attraverso la tecnica di *salt leaching*

Al fine di migliorare l'adesione cellulare, i costrutti (n=3) sono stati immersi in una miscela contenente EtOH/NaOH 0.1M in rapporto di 1:1 ed in una soluzione di NaOH 0.1 M (n=3). Per entrambi i gruppi gli *scaffolds* sono stati posti in incubatore (37 °C, 5% CO₂, umidità relativa 95%) per 15 minuti. Successivamente, al fine di consentire l'evaporazione dell'EtOH, i costrutti sono stati spostati sotto cappa biologica e qui, sono stati sterilizzati mediante raggi UV per 1 h a t.a. Sono stati testati 4 gruppi sperimentali: 1) costrutti trattati con NaOH; 2) costrutti trattati con NaOH /EtOH; 3) costrutti non trattati; 4) gruppo di controllo con cellule in piastra.

Sono state utilizzate cellule umane da vena del cordone ombelicale (HUVECs). Inizialmente, cellule al passaggio 3 sono state poste in piastra ad una densità di 5×10^5 in mezzo di coltura M200 addizionato con Low Serum Growth Supplement Kit (LSGS). Una volta raggiunta una confluenza dell'80%, di solito al terzo giorno di coltura, 1×10^4 cellule sono state sospese in 40 μ l di mezzo e, successivamente, una singola goccia della sospensione è stata posizionata al centro dello *scaffold*. Parallelamente, è stato seminato lo stesso numero di cellule in 3 pozzetti di una piastra *multiwell* da 48 pozzetti per il gruppo di controllo finalizzato ad accertare che le cellule seminate sui costrutti

fossero nelle migliori condizioni dal punto di vista della vitalità e della capacità di proliferazione. Dopo un'ora sono stati aggiunti sui costrutti 60 μ l di mezzo di coltura.

Gli *scaffolds*, dopo 6 h, sono stati spostati in ulteriori pozzetti e sottoposti ad un saggio di vitalità cellulare, con metodo colorimetrico, il *Presto Blue Assay*, in questo caso impiegato per valutare l'adesione delle cellule alle strutture da testare.

A seguire, per la valutazione della proliferazione cellulare, è stato effettuato lo stesso test di vitalità dopo 24 e 48 h.

Per il saggio sono stati posti 90 μ l di mezzo di coltura in ciascun pozzetto, sia in quelli contenenti le cellule che in quelli contenenti i costrutti. In un secondo momento, sono stati aggiunti 10 μ l di reagente. Il Presto Blue è un saggio di vitalità cellulare a base di resazurina che, in funzione dell'attività mitocondriale delle cellule, viene ridotta in quantità variabili determinando una variazione del colore del mezzo di coltura dal blu, corrispondente alla forma ossidata, al rosa, corrispondente alla forma ridotta. Dunque, trascorso il tempo di incubazione prestabilito, il reagente cambia colore in base al potere riducente delle sole cellule vive, consentendone un'analisi quantitativa. Dopo l'aggiunta del reagente, la piastra è stata posta in incubatore per 1 h prima della lettura allo spettrofluorimetro, svolta impostando lo strumento con una lunghezza d'onda di 600 nm.

I risultati sono stati estratti sulla base di una curva di taratura costruita precedentemente misurando, attraverso la stessa metodica, i valori restituiti da quantitativi noti di cellule HUVEC.

Trascorso il tempo di osservazione le cellule appartenenti ai diversi gruppi sperimentali sono state fissate *o/n* a 4°C con paraformaldeide/glutaraldeide in proporzione 4%/2%.

Infine, i campioni sono stati trattati per essere osservati al microscopio a scansione elettronica (SEM) (Zeiss Ultraplus).

4.2.2. Studio su *scaffolds* ottenuti attraverso la tecnica di sinterizzazione termica

I campioni, dopo essere stati sottoposti al trattamento di superficie precedentemente descritto, sono stati divisi in tre gruppi sperimentali: 1) costrutti non trattati; 2) costrutti trattati con NaOH 0.1M.; 3) gruppo di controllo solo cellule.

I test di adesione e proliferazione sono stati svolti nella stessa modalità descritta nel paragrafo precedente.

I tempi di osservazione sono stati fissati a 6, 24 e 48 h e a 3, 5, 7, 9 e 11 giorni. I campioni sono stati fissati con PFA al 4 % *o/n* a 4°C.

Il giorno successivo, i campioni sono stati colorati con Draq 5, un colorante nucleare, e Falloidina 555, colorante per il citoscheletro.

I campioni sono stati, quindi, osservati con l'ausilio di un microscopio confocale (Leica TCS SP5 II) utilizzando i laser 633 con emissione a 650-750 nm, e 543 con emissione a 550-610 nm.

4.2.3. Studio su *scaffolds* fabbricati attraverso la tecnica di replica molding

I costrutti fabbricati con la tecnica di REM e sinterizzati termicamente, non hanno subito nessun trattamento di superficie. La mancanza di trattamento di superficie è motivata dall'applicazione di questa tipologia di *scaffold*. In particolare, tale architettura è stata scelta per contenere le microparticelle di PLGA, le quali saranno poi inserite in un involucro di gelatina. È stato osservato, da protocolli precedentemente adottati dal nostro gruppo di ricerca, che l'idrossido di sodio, usato per migliorare l'adesione cellulare, scioglie la gelatina. Per questo motivo è stato deciso di non utilizzare nessun trattamento di superficie, scelta motivata ancora di più dal fatto che gli strati del costrutto presentano un profilo lineare che favorisce l'adesione cellulare.

Gli scaffolds sono stati seminati con 2×10^4 HUVEC al passaggio 3.

I gruppi sperimentali testati sono stati 2 :1) costrutti seminati; 2) controllo solo cellule; I tempi di osservazione sono stati fissati a 6 e a 48 h e a 7 giorni di coltura.

Sono stati effettuati test di adesione, proliferazione e migrazione cellulare.

I saggi di adesione e proliferazione sono stati svolti con la stessa modalità descritta nei paragrafi precedenti per i costrutti fabbricati con le altre tecniche impiegate.

Per testare la migrazione cellulare, invece, i campioni sono stati inizialmente fissati con PFA al 4% a 4 °C *o/n* e sottoposti a colorazione con Draq 5 e Falloidina 555. Il giorno successivo i costrutti sono stati tagliati in prossimità dei *pillars* con un bisturi mediante l'ausilio di uno stereomicroscopio.

Infine, l'osservazione di ogni singola faccia è avvenuta impiegando un microscopio confocale (Leica TCS SP5 II) con le medesime impostazioni descritte nel paragrafo precedente.

4.2.4. Analisi statistica

L'analisi statistica dei dati è stata effettuata utilizzando le funzioni *t test* e *P value* di Microsoft Excel.

4.3. Saggi di angiogenesi

Per determinare l'attività pro-angiogenica del VEGF rilasciato dalle microsfere di PLGA sono state seminate 1×10^5 HUVEC al passaggio 4 in una piastra da 96 pozzetti, in cui è stato disposto un letto di *Matrigel* preparato alla concentrazione di 13 mg/ml.

Nei singoli pozzetti sono stati poi aggiunti 100 μ l di *Matrigel* e la piastra è stata posta in incubatore per 60 minuti.

Parallelamente, le microparticelle sono state poste a rilasciare in DCM.

Sono stati testati i seguenti gruppi sperimentali: 1) controllo negativo, quindi senza trattamento con il fattore; 2) cellule trattate con 20 ng/ml di fattore; 3) cellule trattate con 40 ng/ml di fattore; 5) cellule trattate

con il degradato ottenuto da microparticelle caricate con 100 ng/ml di fattore.

L'esperimento è durato 6 h, al termine delle quali i campioni sono stati fissati con PFA al 4 % per 20 minuti. A seguire, sono state acquisite le immagini in campo chiaro mediante l'ausilio di un microscopio (Zeiss Microscope).

Per le analisi delle immagini è stato impiegato il *software* Image J.

4.3.1. Analisi statistica

L'analisi statistica dei dati è stata effettuata utilizzando le funzioni *t test* e *P value* di Microsoft Excel.

4.4. Studio in vivo: valutazione del grado di vascolarizzazione degli *scaffolds*

Attraverso lo studio in modello murino sono stati testati *scaffolds* a sei strati fabbricati con la tecnica di sinterizzazione termica.

Per la sperimentazione sono stati utilizzati 6 topi di ceppo BALB/c di sesso femminile ed età 6-8 settimane. Gli animali sono stati sottoposti a terapia analgesica con Carprofen alla dose di 4mg/Kg per via sottocutanea e successivamente anestetizzati con Ketamina/Medetomidina 100mg/kg+0,25mg/kg per via intraperitoneale.

Gli animali sono stati disposti in decubito sternale, dopo disinfezione con Betadine al 10%, è stata praticata un'incisione sagittale lungo la linea mediana di circa 0.5 cm posteriormente alle scapole.

A seguire, è stata praticata una tasca sottocutanea estesa 1 cm, all'interno della quale è stato posto lo *scaffold*, precedentemente sterilizzato e trattato con NaOH 0.1 M. L'incisione è stata suturata con filo da sutura in seta 4/0.

4.4.1 Perfusiones con Microfil ed espianato dei costrutti

Dopo 7 e 21 giorni gli animali sono stati sacrificati mediante la somministrazione di una dose letale di anestetico.

Dopo incisione della cute, apertura del torace ed esposizione del cuore, è stata praticata una perfusione inserendo un ago a livello del ventricolo sinistro. Dopo aver inciso l'atrio destro, gli animali sono stati perfusi con 10 ml di soluzione fisiologica, iniettata con una pompa-siringa alla velocità di 300 ml/h. Immediatamente dopo, sono stati infusi 10 ml di Microfil® alla velocità di 2 ml/min. Il Microfil è una gomma siliconica contenente particelle di piombo utilizzata come mezzo di contrasto allo scopo di consentire la visualizzazione della rete vascolare alla μ -CT evitando, nel contempo, il collasso delle pareti dei vasi. Terminata la perfusione, gli animali sono stati mantenuti a 4°C *o/n* per permettere la polimerizzazione del mezzo di contrasto. Il giorno seguente gli *scaffolds* sono stati prelevati, posti in formalina neutra tamponata al 10% e mantenuti a 4°C fino al momento dell'analisi alla μ -CT.

4.4.2. Analisi istologica

Per l'istologia gli *scaffolds* sono stati fissati in PFA al 4%, inclusi in OCT e conservati a -80°C fino al momento della colorazione. Successivamente i campioni sono stati tagliati al criostato in fettine di 10 μ m di spessore, colorate con Ematossilina-Eosina ed osservate al microscopio ottico (Olympus BX53) al fine di valutare il grado di integrazione dello *scaffold* con il tessuto ospite.

4.4.3. Analisi statistica

L'analisi statistica dei dati è stata effettuata con le funzioni *t test* e *P value* di Microsoft Excel.

4.5 Studio di microfluidica

4.5.1 Disegno e fabbricazione del dispositivo

Per il nostro studio è stato prodotto un dispositivo formato da tre canali: uno centrale, deputato ad accogliere la matrice di collagene, e due laterali, entrambi collegati ad altrettante pompe siringhe (Pagano *et al.*, 2014). Nei due canali è stato immesso mezzo di coltura o PBS a seconda che l'esperimento comportasse o meno l'inserimento di cellule nel dispositivo. In uno dei due canali è stato inserito PBS o mezzo di coltura arricchito con VEGF mentre nell'altro è stato usato solo PBS o mezzo di coltura privo di fattore di crescita.

Il processo è consistito nel disegnare con il *software* Autocad la struttura desiderata. Successivamente, attraverso l'utilizzo del *software* Deskam i file CAD sono stati convertiti consentendo di ottenere una ricostruzione in 3D da un disegno 2D. Lo scopo di questo passaggio è quello di identificare le coordinate (X, Y e Z) da inviare alla macchina per guidarne il movimento. Tale movimento permette di incidere con un'apposita punta, scelta in base alle caratteristiche dimensionali del dispositivo, il disegno sul polimetilmetacrilato (PMMA). Al termine della lavorazione è stato ottenuto uno stampo all'interno del quale è stata colata una soluzione di PDMS/reticolante in rapporto di 10:1 (Sotebier *et al.*, 2012). Successivamente, il polimero all'interno dello stampo è stato mantenuto per 1 h ad una temperatura di 80 °C per permettere la reticolazione. La reticolazione consiste nel passaggio dallo stato liquido allo stato solido del polimero che, in questo modo, assume la forma del dispositivo disegnato nel PMMA o, più precisamente, rappresenta il positivo di essa in quanto lo stampo rappresenta il dispositivo in negativo.

A questo punto del processo, il PDMS è stato prelevato dallo stampo e, attraverso l'impiego di una punta, sono stati prodotti in esso dei fori di 1.5 mm di diametro opportunamente posizionati al fine di consentire l'inserimento dei connettori dei tubi responsabili del trasporto dei fluidi all'interno del sistema. Il dispositivo così ottenuto

è stato lavato con EtOH e sottoposto a trattamento con plasma a 50 W per 1 minuto. Questo ultimo passaggio consiste in un trattamento con gas ionizzato che svolge la funzione di attivare i siti di legame tra due superfici favorendone l'adesione. In questo caso il trattamento al plasma è stato utilizzato allo scopo di fissare il dispositivo ad un vetrino copri-oggetto esercitando una leggera compressione. Il dispositivo così prodotto è stato poi posto in stufa a 100°C per 1 h per favorire l'adesione al vetrino e successivamente, sterilizzato per 1 h a temperatura ambiente sotto lampada UV (Fig.23).

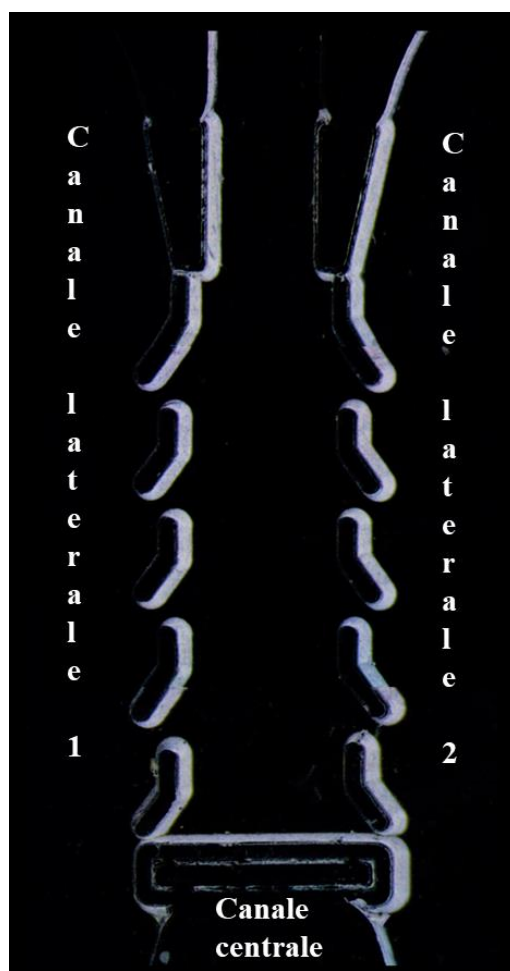


Figura 23: l'immagine mostra una foto del dispositivo al termine del processo di fabbricazione. E' possibile visualizzare i due canali laterali, deputati alla diffusione delle due soluzioni, quella contenente il fattore e quella "povera", ed un canale centrale deputato ad ospitare l'idrogel di collagene, ossia la matrice all'interno della quale diffonde il fattore.

4.5.2 Preparazione della matrice

Il collagene utilizzato per produrre la matrice da impiegare per i nostri esperimenti è quello estratto dalla coda del ratto (Rat tail IBIDI 5 mg/ml).

Il prodotto, dopo essere stato ricostituito con PBS 10X, NaOH 0,1 M e H₂O bidistillata come da indicazioni del produttore, è stato posto in incubatore a 37°C, con il 5% di CO₂ ed il 95% di umidità per 30 min. Per impedire la disidratazione della matrice, il collagene così ottenuto è stato posto in una camera umida inserendo il dispositivo in una piastra petri 100 riempita con acqua sterile.

Nel caso degli esperimenti che hanno incluso la semina di cellule all'interno del dispositivo il collagene è stato integrato, in fase di ricostituzione, con *Matrigel* che, in quanto matrice ricca costituita dalla membrana basale estratta dal sarcoma di topo, favorisce la risposta angiogenica. In particolare, è stato aggiunto collagene alla concentrazione di 1.5 mg/ml, *Matrigel* al 30 %, mezzo di coltura M199 10X, NaOH 0.1 M, 2 % di FBS. Il rapporto collagene: Matrigel ottenuto era pari a 1:3. La matrice così costituita è stata caricata con 1×10^6 cellule e mantenuta per 1 h a 37°C, con il 5 % di CO₂ e il 95 % di umidità al fine di consentirne la fibrillazione (Andrée *et al.*, 2019).

4.5.2. a Funzionalizzazione del collagene con eparina

La funzionalizzazione del collagene è stata svolta sulla base di un protocollo descritto nel 2018 da Font Tellado *et al.*

Inizialmente, è stata preparata una soluzione di collagene di tipo I da coda di ratto alla concentrazione di 1.5 mg/ml con PBS 10 X, acqua bidistillata e NaOH 0.1 M ponendo attenzione a mantenere il tutto in ghiaccio.

Dopo aver disposto 50 µl della soluzione preparata come descritto in sei pozzetti (3 destinati al controllo con collagene standard e 3 destinati al con collagene funzionalizzato) di una piastra IBIDI da 8

pozzetti, la piastra è stata posta in incubatore per 45 minuti per permettere la fibrillazione del collagene.

Contestualmente sono state preparate le soluzioni per la funzionalizzazione. Innanzitutto è stato preparato il buffer MES (2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid) alla concentrazione 0.1 M. a pH bilanciato con NaOH 1M fino ad arrivare ad un valore di 7.5.

Dopo filtrazione della soluzione con filtri da 0.20 μm , è stata preparata la soluzione di eparina, in forma di sale sodico estratto dalla mucosa intestinale di suino, alla concentrazione di 15 mg/ml in MES.

A seguire, sono stati aggiunti N-Hydroxysuccinimide (NHS) 0.125 M e 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (EDC) 0.25 M, agenti in grado di attivare l'eparina attraverso l'aggiunta di due gruppi carbossilici (COOH) alla molecola altrimenti presente in forma inattiva. L'EDC è stato aggiunto immediatamente prima di far partire la reazione, in quanto molto instabile e tendente facilmente alla degradazione.

Per avviare la reazione, la soluzione è stata posta a temperatura ambiente su un agitatore per 15 minuti in assenza di luce.

Allo stesso tempo, trascorsi i 45 minuti necessari per la fibrillazione del collagene, quest'ultimo è stato lavato per 5 volte con il MES al fine di rimuovere i residui di PBS 10X, la cui presenza avrebbe potuto inficiare la riuscita della reazione. Al termine della reazione di legame dell'eparina all'NHS e all' EDC, la soluzione è stata aggiunta al collagene che, così integrato, è stato poi posto in incubatore per 4 h. Questo procedimento riguarda i campioni trattati con eparina, mentre nei campioni controllo è stata aggiunto PBS 1 X.

Al termine del trattamento, il collagene è stato lavato per 5 volte con il MES nei campioni trattati e con il PBS 1 X nei campioni di controllo. Per dimostrare l'efficienza del protocollo testato, è stata preparata una soluzione di VEGF alla concentrazione di 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ con cui sono stati trattati per 3 h gli idrogeli di collagene appartenenti ai due gruppi sperimentali. A seguire, i campioni sono stati lavati con PBS 1 X per 3 volte e poi fissati a 4 °C *o/n* con PFA al 4 %.

4.5.2. b Reazione di immunofluorescenza

Il giorno successivo, i campioni sono stati ancora una volta lavati con PBS 1 X per tre volte per 5 minuti per eliminare la PFA. Contestualmente, sono state preparate le soluzioni di permeabilizzazione e di blocco, rispettivamente tryton 100X alla concentrazione di 0.2 % e BSA all'1% con glicina alla concentrazione di 22.52 mg/ml in PBST (PBS 1X addizionato con Tween 20 alla concentrazione di 0.1%).

Dopo la permeabilizzazione, della durata di 10 minuti a t.a., sono stati effettuati tre lavaggi di 5 minuti con PBS 1X. Successivamente, è stata inserita la soluzione di blocco per 30 minuti.

A seguire, sono stati diluiti 5 µl di anticorpo anti-VEGF coniugato con Alexafluor 647 all'interno della soluzione di blocco in rapporto 1:100.

Dopo la reazione di blocco i campioni sono stati lavati 3 volte per 5 minuti con PBS mentre la reazione di immunofluorescenza è stata svolta a 4°C *o/n* in camera umida in assenza di luce.

Il giorno seguente si è proceduto all'osservazione dei pozzetti contenenti il collagene con un microscopio confocale (Leica TCS SP5 II) per poi procedere alla quantificazione del segnale di fluorescenza tramite il laser 633 nm.

4.5.2 c Saggi di angiogenesi in piastra

Prima di testare la matrice costituita da collagene e *Matrigel* all'interno del dispositivo, è stato effettuato un saggio di angiogenesi volto a testare l'adeguatezza della matrice a sostenere la formazione di strutture pseudo-capillari.

Per il saggio è stata impiegata una linea cellulare derivata da endotelioma murino denominata bEND e generalmente utilizzata come modello *in vitro* di barriera ematoencefalica.

Per la coltura sono state quindi piastrate in una piastra petri 100 mm 5 x 10⁵ di cellule bEND per 2 giorni in mezzo di coltura DMEM ad

elevato contenuto di glucosio con 10% di FBS, 1% di Penicillina/Streptomicina, 1% di L-glutamina, 1% di sodio piruvato e 2% di amminoacidi non essenziali. Dopo aver raggiunto una confluenza dell'80% le cellule sono state staccate attraverso trattamento con 1 ml di tripsina per 5 minuti. Successivamente, 5×10^4 cellule sono state sospese in 50 μ l di *working solution* di collagene prodotta seguendo il protocollo descritto nella sezione 6.2 e seminate in 5 pozzetti di una piastra *multiwell* da 48 pozzetti. Una volta disposta nella piastra, la matrice è stata mantenuta in incubatore per 1 h al fine di consentire la fibrillazione. In ciascun pozzetto contenente la matrice fibrillata con le cellule sono stati poi aggiunti 200 μ l di mezzo di coltura. Gli *endpoints* dell'esperimento sono stati fissati a 6, 24 e 48 h trascorse le quali i campioni sono stati osservati sia in campo chiaro che in fluorescenza con l'ausilio di un microscopio Twin Zeiss Microscope Incubator Chamber.

Prima di procedere all'osservazione in fluorescenza i campioni sono stati colorati con falloidina 488 e Draq 5 per evidenziare rispettivamente il citoscheletro e il nucleo.

4.5.3 Caratterizzazione di un gradiente di concentrazione con molecola modello

Al fine di testare l'adeguatezza del dispositivo nel generare un gradiente di concentrazione controllabile impiegando una molecola modello è stato utilizzato destrano con peso molecolare 40 kDa, analogo a quello del VEGF, coniugato con rodamina, alla concentrazione di 200 μ g/ml. Si è poi proceduto ad effettuare una osservazione in *time-lapse* con l'ausilio di un microscopio confocale (Leica TCS SP5 II) con laser 543 nm ed obiettivo 10 X mantenendo le condizioni ambientali a 37 °C con il 5% di CO₂ e il 95% di umidità al fine di evitare che l'elevata temperatura disidratasse il collagene. Questo perché ci siamo resi conto che il collagene fibrillato mantenuto a temperatura ambiente si deteriora, come riportato anche da studi presenti in letteratura (Bozec et al., 2011).

In primo luogo, sono state valutate la distribuzione e la qualità del collagene all'interno del dispositivo mediante la tecnica della generazione della seconda armonica, con l'ausilio di un microscopio confocale (TCS SP5 II Leica) combinato con un multifotone equipaggiato con un laser *sapphire* (Chameleon Compact OPO-Vis, Coherent). L'osservazione è stata effettuata con un obiettivo 25 X ad acqua (HCX IRAPO L 25.0X0.95 Water, n. a. 0.95).

A seguire, nei due canali di ingresso sono stati immessi rispettivamente destrano rodaminato e PBS alla portata di 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ e PBS per un tempo di 15, 60 e 90 minuti. Si è poi proceduto all'osservazione tramite microscopio confocale (Leica TCS SP5 II) (Fig.24).

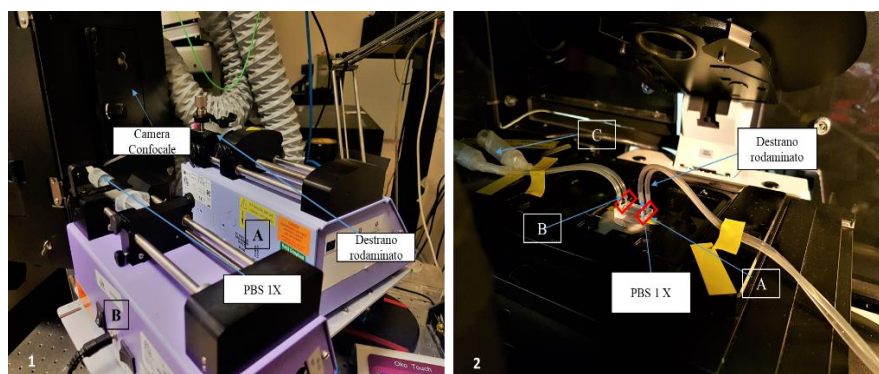


Figura 24: L'immagine mostra due fasi della messa a punto dell'esperimento di diffusione del destrano coniugato con rodamina nel dispositivo posto all'interno della camera di incubazione del microscopio confocale per l'osservazione in *time-lapse*. Nel pannello 1 sono visibili due pompe, caricate con altrettante siringhe, disposte all'esterno della camera. E' possibile notare che una siringa contiene destrano rodaminato (A) mentre l'altra contiene PBS 1 X (B).

Nel pannello 2 si può osservare il dispositivo, adeguatamente collegato alle pompe siringhe, posizionato nella camera del microscopio confocale a 37°C e 5% di CO₂ per impedire la disidratazione del collagene. I tubi responsabili del trasporto della soluzione con destrano e del PBS 1X dalle siringhe al dispositivo sono stati connessi all'*inlet*, quindi all'ingresso dei canali laterali 1 e 2 (A), mentre all'*outlet*, quindi all'uscita (B) sono stati collegati i tubi deputati a raccogliere gli stessi fluidi in uscita dal dispositivo ed a trasportarli a due *reservoirs*, serbatoi, rappresentati da 2 provette falcon da 50 ml (C).

4.5.4. Simulazione numerica

Al fine di verificare che la geometria del dispositivo fosse adeguata a consentire lo sviluppo di un gradiente nella matrice di collagene contenente cellule, è stata eseguita una simulazione con il *software* COMSOL. In particolare, poiché la generazione e il mantenimento di un gradiente stabile è influenzata dal coefficiente di diffusione delle molecole all'interno dell'idrogelo ma, soprattutto, dalle caratteristiche geometriche del dispositivo, si è provveduto a ricercare la miglior portata possibile così da garantire un gradiente stabile e una velocità di portata che non arrecasse danni alla matrice di idrogelo allocata nel dispositivo. La simulazione è stata svolta combinando il modulo flusso laminare con il modulo trasporto di specie diluite in mezzi porosi, modellando l'idrogelo di collagene come un mezzo poroso e usando come molecola diffusiva il Destrano 40 kDa con coefficiente di diffusione pari a $2 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ (Pagano et al., 2014).

4.5.5 Studio del gradiente di concentrazione di VEGF

Il collagene, preparato seguendo il protocollo precedentemente descritto, è stato funzionalizzato come descritto dalla sezione 4.5.1.a. Successivamente, è stata preparata una soluzione di VEGF/PBS 1 X ad una concentrazione pari a 60 ng/ml.

A seguire, sono state caricate due pompe siringhe impostate ad una portata di 1 $\mu\text{l}/\text{min}$, una per ciascun canale laterale, contenenti uno PBS con VEGF e l'altro solo PBS 1X (Fig.25).

La durata dell'osservazione è stata fissata a 3 h in quanto attraverso la simulazione svolta mediante il *software* COMSOL il gradiente di concentrazione, partendo da una concentrazione di partenza pari a 0.6 nmol, è stato ottenuto, appunto, dopo 3 h di diffusione. Dopo questo arco di tempo, è stato osservato che il gradiente tende a diventare stabile, fino ad arrivare a 6 h, tempo dopo il quale viene raggiunto il

plateau, ossia il momento in cui la concentrazione di VEGF è la medesima in tutto il canale centrale.

Al termine del periodo di osservazione, i dispositivi sono stati fissati con PFA al 4% *o/n* a 4°C mentre il giorno successivo è stata svolta la reazione di immunofluorescenza con anticorpo anti-VEGF, previa permeabilizzazione e blocco *o/n*. Successivamente, si è proceduto a quantificare il segnale in fluorescenza mediante un microscopio confocale (Leica TCS SP5 II) come descritto nella sezione 4.5.1.b.

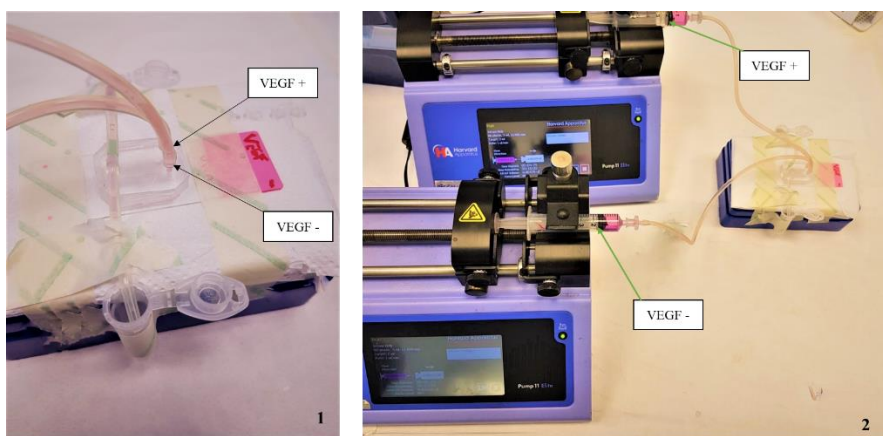


Figura 25: l'immagine mostra la fase di messa a punto dell'esperimento indirizzata allo studio del gradiente di concentrazione del VEGF all'interno del dispositivo. Nel pannello 1 si può osservare il dispositivo collegato ai due tubi contenenti uno mezzo con VEGF e l'altro mezzo privo di fattore. Il pannello 2 mostra in che modo le pompe siringhe sono state collegate al dispositivo ed in quale condizione sono stati messi a punto i parametri di flusso quali portata, volume e tipologia di siringa da impiegare per un'ottimale erogazione dei fluidi.

4.5.6. Studio dell'effetto biologico di un gradiente di concentrazione di VEGF

Sia nel caso delle cellule bEND che nel caso delle HUVEC sono state piastrate 5×10^5 cellule in una piastra Petri da 100 mm. Una volta raggiunta una confluenza dell'80%, le cellule sono state staccate dalla piastra mediante trattamento con 1 ml di tripsina per 5 minuti e successivamente contate. In 10 μ l di soluzione di collagene e *Matrigel* sono state poi sospese 1×10^4 cellule, la sospensione cellulare è stata quindi caricata all'interno del dispositivo. Il dispositivo così caricato

è stato posto per 1 h in camera umida all'interno dell'incubatore al fine di consentire la fibrillazione della matrice contenente le cellule. Successivamente sono stati aggiunti 10 μ l di mezzo di coltura, specifico per il citotipo usato, in entrambi i canali laterali per 24 h per consentire alle cellule di adattarsi alla matrice.

Si è poi proceduto a stimolare le cellule all'interno del dispositivo (n=4) con VEGF alla concentrazione di 60 ng/ml in uno dei due canali laterali, mentre il canale opposto è stato caricato con solo mezzo di coltura antibiotato. I tempi di osservazione sono stati 6, 24 e 48 h. Al primo *time-point*, corrispondente a 6 h, le cellule sono state stimulate usando due pompe siringhe le quali, con una velocità di portata pari a 1 μ l/min, inviavano il mezzo all'interno dei due canali. I successivi *time-points* sono stati 24 e 48 h nel caso delle bEND, e 24 h per le HUVEC. La diversa tempistica per le due linee cellulari è stata selezionata in base alla maggiore o minore rapidità dei due citotipi di adattarsi alle specifiche condizioni sperimentali. Ad ogni *endpoint* è stata svolta un'osservazione sia in campo chiaro che in fluorescenza attraverso l'ausilio di un microscopio Twin Zeiss e di un microscopio confocale (Leica TCS SP5 II) rispettivamente.

4.6. Bibliografia

1. C. Sotebier, A. Michel and J. Fresnais Polydimethylsiloxane (PDMS) Coating onto Magnetic Nanoparticles Induced by Attractive Electrostatic Interaction *Appl. Sci.* (2012), 2, 485-495
2. B. Andrée, H. Ichanti, S. Kalies, A. Heisterkamp, S. Strau, P.M. Vogt, A. Haverich & A. Hilfiker Formation of three-dimensional tubular endothelial cell networks under defined serum-free cell culture conditions in human collagen hydrogels *Scientific Reports* (2019) 9:5437
3. S. Font Tellado, S. Chiera, W. Bonani, P.S.P. Poha, C. Migliaresi A. Motta, E. R. Balmayora, M. Griensvena Heparin functionalization increases retention of TGF- β 2 and GDF5 on biphasic silk fibroin scaffolds for tendon/ligament-to-bone tissue engineering *Acta Biomaterialia* (2018) 72 150–166151
4. G. Pagano, M. Ventre,¹ M. Iannone, F. Greco, P. L. Maffettone, and P. A. Netti Optimizing design and fabrication of microfluidic devices for cell cultures: An effective approach to control cell microenvironment in three dimensions *Biomicrofluidics* (2014) 8, 046503
5. Cesarelli G. Engineering novel scaffolds with in silico designed microarchitectures and potentially suitable for spatio-temporal drugs release Ph D thesis 32 cycle

Capitolo 5

5. Risultati

5.1. Interazione cellula-materiale

5.1.1. Studio su *scaffolds* di PCL fabbricati con la tecnica *salt leaching*

I risultati ottenuti dagli esperimenti di interazione tra le cellule HUVEC e gli *scaffolds* di PCL fabbricati con la tecnica del *salt leaching*, hanno mostrato che per gli *scaffolds* sottoposti ad entrambe le tipologie di trattamento di superficie, ossia con NaOH 0.1 M/EtOH 97% (1:1) e con NaOH 0.1 M, il numero di cellule adese è risultato maggiore rispetto al numero di cellule adese riscontrato nel gruppo costituito da *scaffolds* che non avevano subito nessun trattamento (Grafico 1).

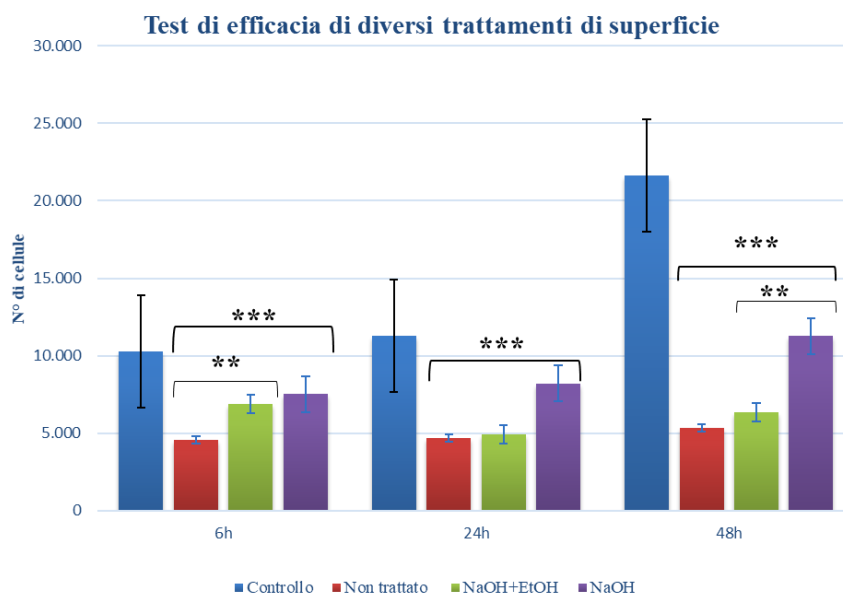


Grafico 1: il grafico illustra il numero di cellule adese agli scaffold sottoposti ai due trattamenti di superficie testati ai diversi *time-points* considerati. Le barre in blu corrispondono al gruppo controllo costituito dalle cellule in piastra (n=3). (**) *P value* < 0,01; (***) *P value* < 0,001.

Confrontando i due trattamenti, con NaOH/EtOH e con NaOH 0.1 M, si è osservato che 6 ore dopo la semina l'adesione cellulare era migliore nel caso del trattamento con NaOH 0.1 M con il 72.9 % delle cellule seminate pari a 7.512 cellule che avevano aderito agli *scaffolds*, rispetto a quanto verificatosi a seguito del trattamento con NaOH/EtOH, caso in cui la percentuale di cellule adese agli *scaffolds* è risultata del 66.2%, corrispondente a 6.887 cellule adese ai costrutti. Gli *scaffolds* sottoposti ad entrambi i trattamenti di superficie hanno, comunque, mostrato un risultato migliore per quanto riguarda l'adesione cellulare rispetto ai costrutti non trattati, i quali hanno mostrato una percentuale di adesione pari al 44.2 %, corrispondente 4.552 cellule adese.

Per quanto concerne la proliferazione cellulare, dopo 24 h dalla semina è stato rilevato un numero maggiore di cellule nel caso dei costrutti trattati con NaOH 0.1 M pari a 8.202 cellule, mentre nel caso di quelli trattati con NaOH/EtOH è stato rilevato un minore livello di proliferazione con un numero di cellule pari a 4.901. Nei costrutti non trattati, invece, sono state contate 4.671 cellule.

Diversamente, a 48 ore dalla semina sulla superficie e all'interno dei costrutti trattati con NaOH/EtOH è stato osservato un aumento della proliferazione cellulare con un numero di cellule pari a 6.332. Al contrario, sulla superficie e all'interno degli *scaffolds* trattati con NaOH 0.1M è stato riscontrato un aumento notevole della proliferazione con un numero di cellule pari a 11.263. Infine, sulla superficie e all'interno dei costrutti non sottoposti ad alcun trattamento, il numero di cellule si è mantenuto costante nel tempo, denotando un'assenza di proliferazione cellulare riconducibile alla mancanza di una condizione adeguata a favorire lo svolgimento dei normali processi di duplicazione cellulare.

Come si può osservare nella figura 26, che mostra le cellule HUVEC sulla superficie di uno *scaffold* (A) trattato con NaOH 0.1M dopo 48 h dalla semina, le cellule hanno mantenuto la classica morfologia (B), in particolare l'osservazione al SEM ha consentito di evidenziare cellule distese tra un poro e l'altro del costrutto (C-D), nonché la

presenza dei caratteristici *filopodia* che testimoniano l'interazione attiva delle cellule con la matrice circostante, costituita in questo caso dal costrutto.

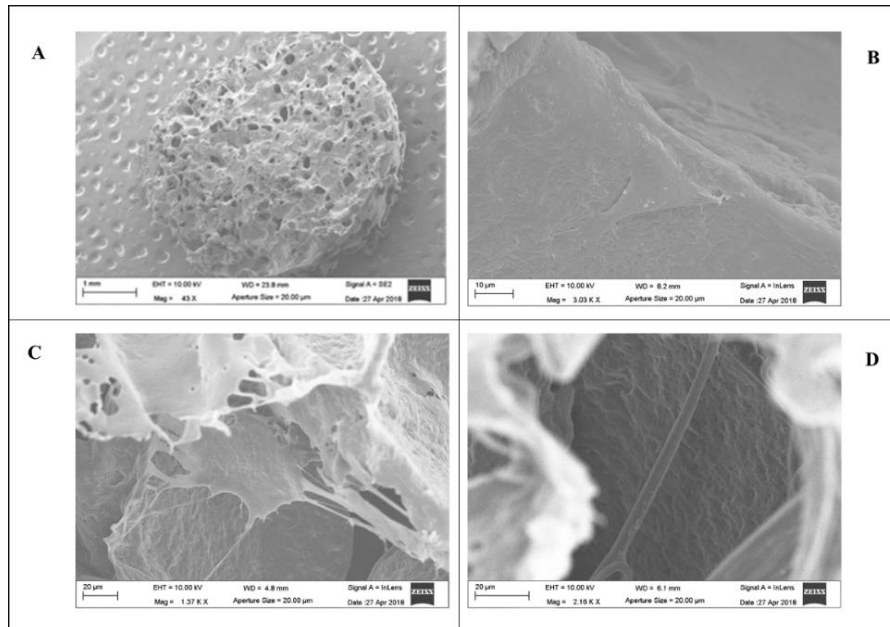


Figura 26: l'immagine mostra un'acquisizione effettuata con il microscopio a scansione elettronica (SEM) di uno *scaffold*. In A si osserva il solo *scaffold*. In B è possibile apprezzare una singola cellula di forma triangolare posizionata sulla superficie del costrutto. In C sono visibili le cellule distese tra i pori del costrutto, mentre in D è possibile notare il particolare di un *filopodium* di una cellula disteso tra i margini di due pori (n=3).

5.1.2. Studio su *scaffolds* di PCL fabbricati con la tecnica di sinterizzazione termica

A seguito dei risultati restituiti dallo studio di interazione cellula-materiale in cui è stata confrontata l'efficacia dei due trattamenti di superficie effettuati, con NaOH/EtOH e NaOH 0.1 M, sui costrutti fabbricati con la tecnica di *salt leaching* è emerso che il trattamento con NaOH 0.1 M è il più efficace dei due. Per questo motivo, nel caso degli *scaffolds* fabbricati con la tecnica della sinterizzazione chimica si è proceduto a confrontare soltanto costrutti sottoposti a trattamento con NaOH 0.1 M con costrutti non sottoposti ad alcun trattamento. I risultati ottenuti hanno mostrato che nel caso dei costrutti trattati, il

numero di cellule adese era maggiore rispetto al numero rilevato nel caso degli *scaffolds* che non avevano subito nessun trattamento.

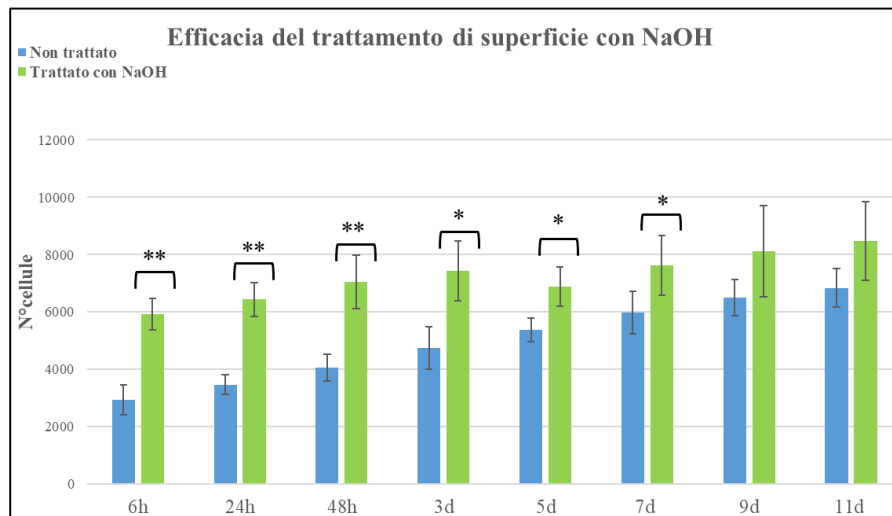


Grafico 2: il grafico illustra il numero di cellule adese agli *scaffolds* sottoposti ad un trattamento di superficie testato ai diversi time-points considerati. Le barre in blu corrispondono al gruppo controllo costituito da *scaffolds* non trattati (n=3). (**) P value < 0,01; (*) P value < 0,05.

Come mostrato nel Grafico 2 dal confronto tra i due gruppi sperimentali si evidenzia che nel caso degli *scaffolds* trattati con NaOH 6 ore dopo la semina l'adesione cellulare risultava migliore. La percentuale di cellule adese ai costrutti appartenenti al gruppo trattato è risultata, infatti, pari al 57.7 % delle cellule seminate, valore corrispondente a 5.925 cellule, verso un valore del 28.7 %, pari a 2.942 cellule, rilevato nel caso dei costrutti non trattati.

Ai successivi *endpoints* è stato, invece, osservato che i costrutti trattati presentavano un numero di cellule stabile, al contrario di quanto si è evidenziato nel caso dei costrutti non trattati, per i quali il numero di cellule si è rivelato crescente, anche se limitatamente, fino al termine dello studio, fissato ad 11 giorni di coltura.

La ridotta differenza nella proliferazione cellulare in entrambi i gruppi, dove nel caso dei costrutti trattati si è ottenuto ad 11 giorni un numero di cellule massimo pari a 8.477, mentre nei non trattati il numero rilevato allo stesso *time-point* è stato di 6.833 cellule può essere giustificata dal fatto che la struttura dei costrutti, caratterizzata

da una notevole porosità, non si è rivelata adeguata all'invasione cellulare essendo caratterizzata da un'architettura che favorisce la percolazione e quindi non in grado di ritenere all'atto della semina, un volume di sospensione cellulare contenente un numero di cellule adeguato a favorire la proliferazione nelle fasi successive.

Come si può notare esaminando la figura 27, le cellule presenti sulla superficie e all'interno degli *scaffolds* trattati presentano la caratteristica morfologia allungata, propria delle cellule HUVEC.

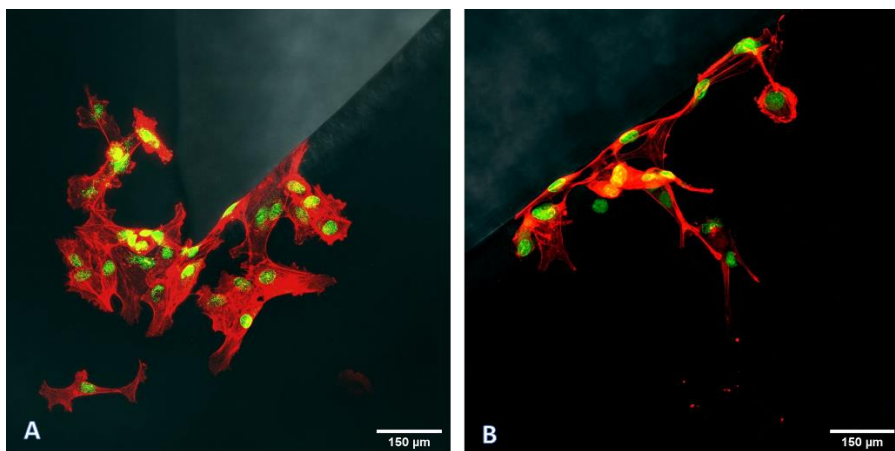


Figura 27: l'immagine mostra gruppi di cellule HUVEC coltivate su uno scaffold prodotto con la tecnica della sinterizzazione. In A le cellule si sono disposte tra due microsfeere, in particolare su un colletto che unisce due di esse. In B, invece, è possibile notare alcune cellule posizionate sulla superficie di una microsfera (n=3).
Scale bar: 150 µm.

5.1.3. Studio su *scaffolds* fabbricati con la tecnica di *replica molding*

Analizzando i risultati ottenuti dagli esperimenti di interazione cellula-materiale sugli *scaffolds* fabbricati con la tecnica di REM si osserva che i dati dell'adesione cellulare, erano in linea con quelli restituiti dai precedenti esperimenti.

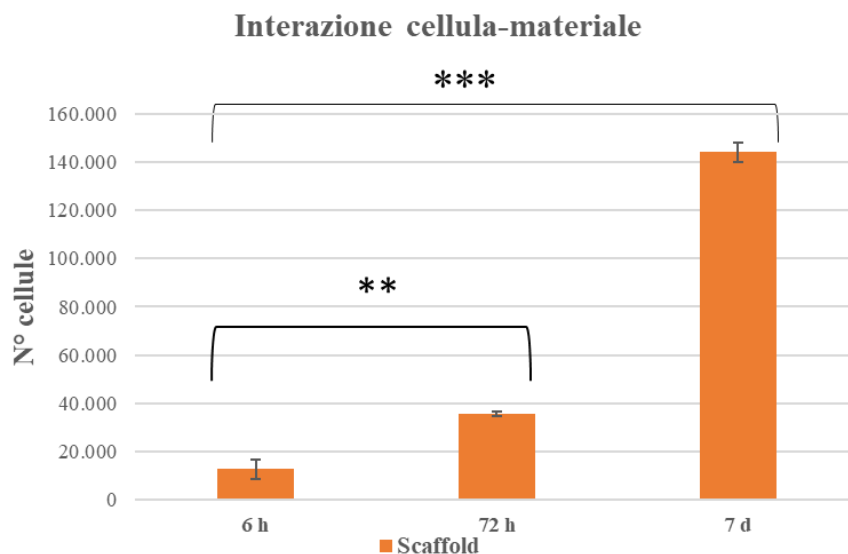


Grafico 3: il grafico illustra il numero di cellule adese agli *scaffolds* fabbricati con la tecnica *replica molding* (n=3). (**) P value < 0,01; (***) P value < 0,001.

Infatti, come mostrato nel grafico 3, i risultati ottenuti dai test di adesione cellulare hanno mostrato che il 68.6 % delle cellule seminate, pari a 12.696 cellule, ha aderito ai costrutti.

I risultati rilevati ai successivi *endpoints* hanno mostrato una tendenza alla proliferazione tangibilmente crescente.

Per quanto concerne il fenomeno della migrazione cellulare, si è osservato che, come si evidenzia dalle immagini riportate nella figura 28, 6 ore dopo la semina le cellule erano presenti sia sullo strato superficiale, sede della semina, che nello strato intermedio, mentre risultavano assenti nello strato inferiore.

Diversamente, a 72 h dalla semina le cellule erano presenti in tutti e tre gli strati, dato confermato anche a 7 giorni.

Questo risultato ha permesso non solo di confermare l'andamento della proliferazione cellulare, risultato molto evidente in concordanza anche con quanto mostrato dal grafico 3, ma anche di affermare l'adeguatezza della struttura ai fenomeni di migrazione cellulare che hanno avuto luogo attraverso i diversi strati degli *scaffolds*.

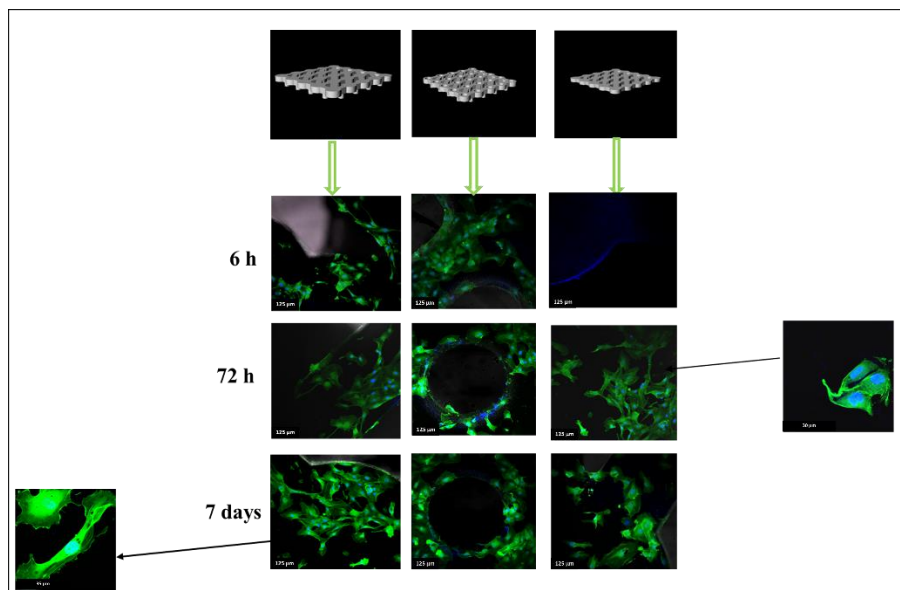


Figura 28: l'immagine mostra le cellule HUVEC sulla superficie e all'interno *scaffold*. E' possibile osservare che 6 h dopo la semina le cellule erano o presenti sullo strato superiore e in quello intermedio, mentre erano totalmente assenti nello strato inferiore. Diversamente, a 72 h e a 7 giorni le cellule erano presenti su tutti e tre gli strati (n=3) Scale bar 125 μm , dettagli 35 e 30 μm (Cesarelli G. PhD thesis).

5.2. Saggio di angiogenesi *in vitro*

Dopo aver testato la biocompatibilità di *scaffolds* scarichi, quindi non caricati con il VEGF, caratterizzati da una diversa organizzazione strutturale, si è proceduto a progettare e a fabbricare microparticelle di PLGA e gelatina caricate con il fattore di crescita. Per determinarne l'efficacia di incapsulamento è stato svolto un saggio di angiogenesi con una matrice pro-angiogenica, il Matrigel. I risultati ottenuti mediante questo saggio hanno dimostrato che confrontando il numero di segmenti o strutture pseudo-capillari (Fig. 29) formatesi nei diversi gruppi sperimentali, l'effetto ottenuto sulle cellule stimulate dal degradato era paragonabile sia a quelle stimulate con 20 ng/ml di VEGF che a quelle stimulate da 40 ng/ml di VEGF. Per "degradato" si intende una soluzione contenente le microparticelle caricate con il fattore e sottoposte a dissoluzione attraverso immersione, in una soluzione di DCM, al fine di poter misurare la quantità di fattore effettivamente presente all'interno di esse.

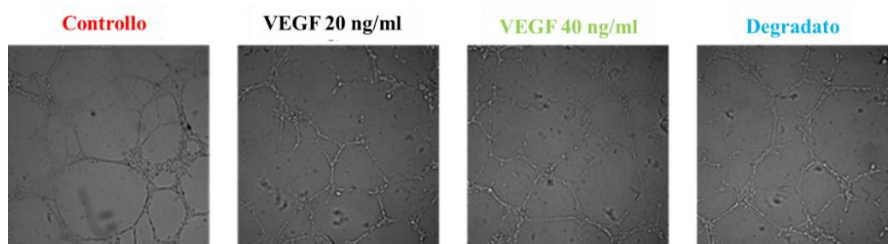


Figura 29: le immagini mostrano le cellule HUVEC seminate su un letto di Matrigel. Sono stati testati 4 gruppi sperimentali: controllo, cellule trattate con 20 ng/ml di VEGF, cellule trattate con 40 ng/ml di VEGF e cellule trattate con il degradato (n=4).

Come risulta evidente nel grafico 4, il numero di segmenti che si sono formati in seguito alla stimolazione con 20 ng/ml di VEGF erano approssimativamente 8.200, mentre nel caso della stimolazione con 40 ng/ml ne sono risultati circa 9.200. Poiché nel caso delle cellule sottoposte a stimolazione con il mezzo di coltura contenente il degradato da microsferi di PLGA caricate con 100 ng/ml di VEGF i segmenti rilevati sono risultati 8.500, l'efficienza di incapsulamento delle stesse è risultata pari al 30% del fattore caricato al loro interno.

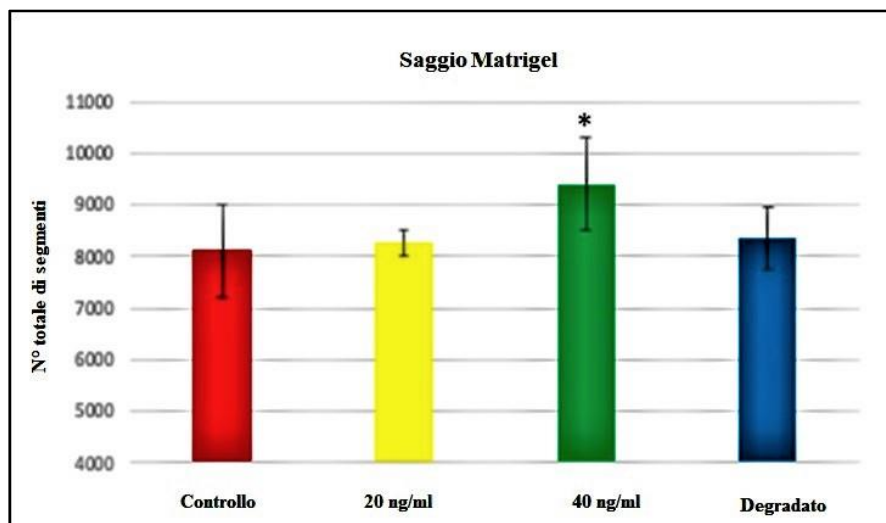


Grafico 4: il grafico mostra il numero di strutture pseudo-capillari nei quattro gruppi sperimentali. L'effetto biologico più evidente è stato riscontrato nel gruppo trattato con 40 ng/ml di VEGF, mentre le cellule del gruppo trattato con il degradato hanno restituito un risultato simile a quello delle cellule del gruppo trattato con 20 ng/ml di fattore (n=4). *P value* < 0,05 (*) gruppo 40 ng/ml vs gruppo controllo.

5.3. Studio *in vivo*

5.3.1. Analisi del potenziale angiogenico via μ -TAC

L'analisi degli *scaffolds* prelevati dopo 3 settimane dall'impianto ed effettuata attraverso la tecnica della μ -TAC è stata volta ad operare un confronto relativo al potenziale angiogenico di due tipologie di costrutti, con due diverse organizzazioni architettoniche caratterizzate, a seconda del caso, da una maggiore o minore porosità. I risultati ottenuti dall'analisi alla μ -TAC hanno consentito di misurare il volume occupato dai vasi sanguigni all'interno dello *scaffold*, nonché la distribuzione e il diametro degli stessi.

Per una migliore comprensione dei risultati, lo *scaffold* è stato suddiviso in tre zone, indicate come zone 1, 2 e 3 (Fig.30). La zona 1 corrisponde a quella considerata come prossimale in cui è stato osservato il maggior numero di vasi, la zona 2 corrisponde alla zona intermedia mentre la zona 3 corrisponde alla zona considerata come distale. Prossimale e distale si riferiscono alla “fonte”, vale a dire ai vasi dai quali è partito il processo di *sprouting* verso l'interno del costrutto, quindi la denominazione scaturisce dal fatto che come punto di riferimento è stato preso in considerazione il distretto anatomico dal quale è partito il processo angiogenico.

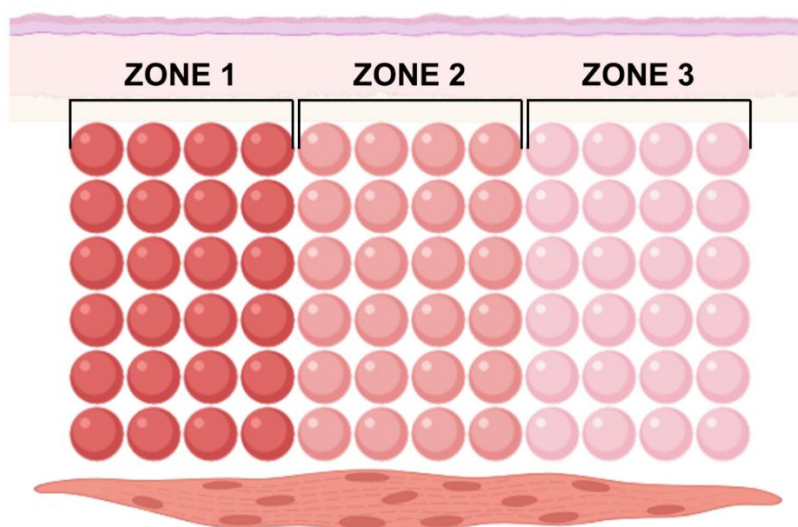


Figura 30: la figura mostra una rappresentazione grafica della suddivisione dello *scaffold* in zone. La zona 1 corrisponde all'area con un maggior numero di vasi, seguita dalla zona 2 e dalla zona 3 che, invece, corrisponde all'area raggiunta dal minor numero di vasi.

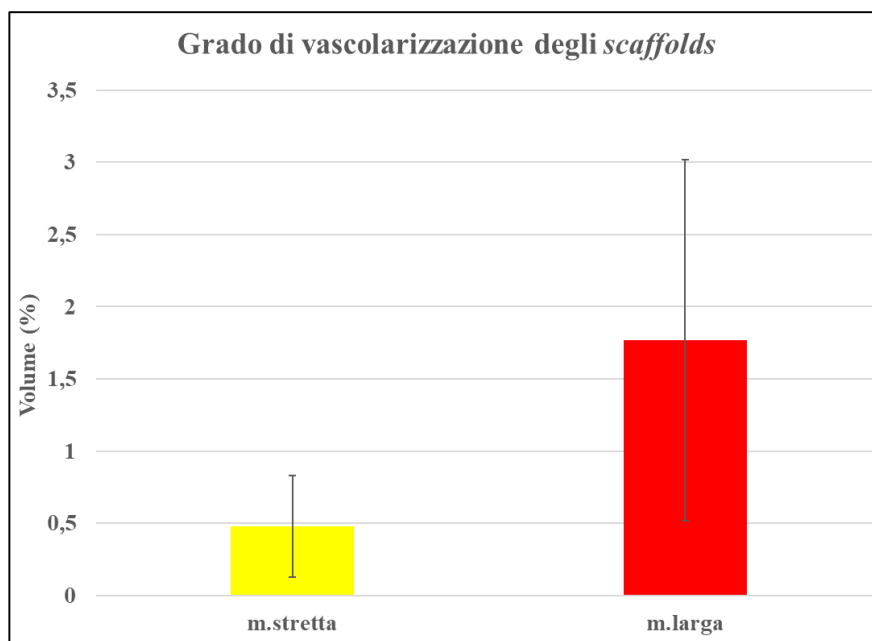


Grafico 5: il grafico mostra un'analisi in percentuale del volume di vasi occupato dai vasi sanguigni tra due tipologie di *scaffolds*, una avente una struttura a maglia stretta e l'altra avente una struttura a maglia larga. In y è indicato il volume in % dei vasi occupati. I costrutti sono stati impiantati in un modello di tasca sottocutanea ed espianati dopo 21 giorni (n=6).

Dall'analisi della percentuale del volume dei costrutti occupata dai vasi è risultato che la struttura più favorevole all'invasione vascolare era quella a maglie larghe in cui la frazione di volume degli *scaffolds* occupata dai vasi è risultata maggiore rispetto a quella degli *scaffolds* con struttura a maglie strette (Grafico5).

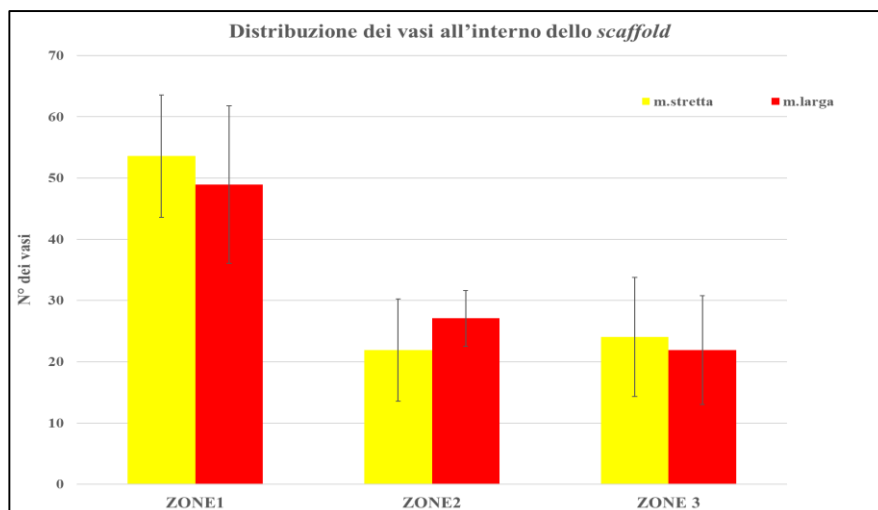


Grafico 6: il grafico mostra l'analisi della distribuzione dei vasi nelle diverse zone dello *scaffold*. In y è indicato il numero dei vasi, mentre in x sono indicate le zone dello *scaffold*. Qui sono confrontati i dati della distribuzione di due tipologie di *scaffolds*, uno a maglia stretta ed uno a maglia larga. Il maggior numero di vasi è stato riscontrato nella zona 1 dello *scaffold* a maglia stretta (n=6).

Per quanto riguarda la distribuzione dei vasi, tuttavia, in entrambe le tipologie di costruito, la zona 1 è stata quella all'interno della quale è stato riscontrato il maggior numero di vasi con un numero più elevato nel caso della struttura a maglie strette. Nel caso della zona intermedia, invece, l'architettura a maglie larghe è risultata essere più favorevole mentre nel caso della zona 3 il maggior numero di vasi è stato nuovamente riscontrato negli *scaffolds* con struttura a maglie strette (Grafico 6).

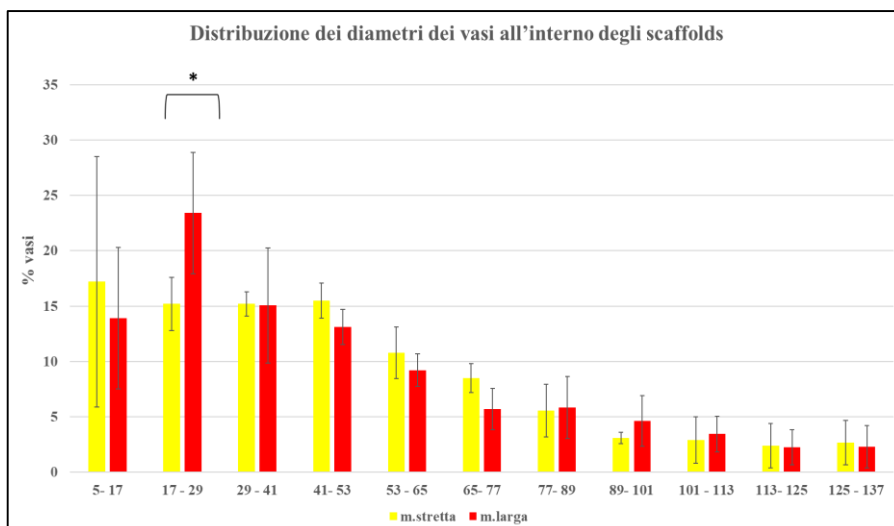


Grafico 7: il grafico mostra in percentuale la distribuzione dei diametri dei vasi nelle due tipologie di scaffolds, a maglia stretta e a maglia larga. Dal grafico in cui in y è indicata la % dei vasi e in x il diametro in µm dei vasi, si rileva che i diametri dei vasi che presentano una maggiore prevalenza sono quelli compresi tra 17 e 29 µm, con una distribuzione in percentuale pari al 24,9% del totale. Tali valori sono stati riscontrati all'interno dei costrutti con struttura a maglia stretta (n=6). *P value* < 0,05.

Per quanto concerne l'analisi della distribuzione dei diametri dei vasi, come si osserva nel grafico 7 il diametro che ha mostrato una maggiore prevalenza nell'analisi è stato osservato nello *scaffold* con un'architettura a maglia larga, in cui è stato riscontrato che il 24,9% dei vasi contati presentava un diametro compreso tra 17 e 29 µm, mentre la percentuale più bassa riscontrata, pari al 2,3 % corrispondeva a vasi con un diametro compreso tra 125 e 137 µm, in concordanza con quanto ci aspettavamo in quanto è fisiologico che i vasi di calibro minore che si formano all'interno di una struttura porosa in una fase iniziale siano più numerosi di quelli di calibro maggiore. E' interessante notare che l'unica classe di diametri in cui è stata evidenziata una differenza significativa dal punto di vista statistico tra le due strutture di *scaffolds* è quella 17-29 µm.

5.4. Integrazione degli *scaffolds* con l'organismo ospite

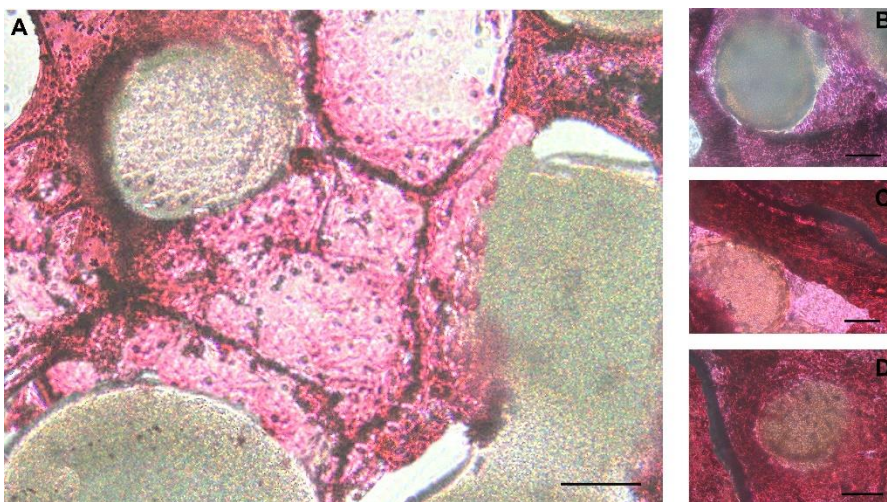


Figura 31: la figura mostra delle immagini di sezioni di *scaffolds* impiantati in un modello di tasca sottocutanea ed espantati a 21 giorni. In A si nota lo sviluppo di una rete vascolare con i vasi evidenziati dal colore scuro per la presenza del Microfil. In B si può notare una singola sfera che il tessuto in via di formazione ha perfettamente circondato una microsfera. In C si nota chiaramente un vaso sanguigno che decorre all'interno del tessuto neoformato mentre in D è possibile notare sia il tessuto che circonda le microsferi che un vaso che lo percorre (n=6). *Scale bar* A, C, D 100 μ m, B 50 μ m.

L'analisi istologica condotta sugli *scaffolds* impiantati e prelevati dopo un tempo di osservazione di 3 settimane è stata effettuata a corredo dei risultati ottenuti all'analisi alla μ -TAC al fine di rilevare il grado di integrazione dello *scaffold* con il tessuto dell'ospite. Le immagini, riportate in figura 31 hanno rivelato la presenza di tessuto murino all'interno del costruito (B). Oltre alla presenza di vasi sanguigni e di una rete vascolare visibile in (A) e (C), è risultato evidente che il tessuto neoformato si è distribuito omogeneamente all'interno dei pori del costruito andando a circondare le singole microsferi come è evidente in (D). I vasi sanguigni, riscontrati all'interno del tessuto neoformato, risultano di colore scuro in quanto contenenti l'agente di contrasto per la micro-TAC, il Microfil, che, essendo costituito da microparticelle di piombo assume questa colorazione a seguito della precipitazione delle stesse.

5.5. Studio in microfluidica

5.5.1. Studio di funzionalizzazione del collagene in piastra

A seguito dell'analisi dei risultati dello studio di funzionalizzazione del collagene svolto ponendo gli idrogeli in pozzetti di una piastra IBIDI a 8 pozzetti, si è potuto osservare che il protocollo adottato era adatto al nostro scopo.

Come evidenziato nella figura 32, in cui sono state poste a confronto la gradazione di fluorescenza del collagene non funzionalizzato (a) con quella del collagene funzionalizzato (b), quest'ultimo mostra di aver adsorbito un quantitativo molto maggiore di VEGF rispetto al controllo, dato confermato anche dall'analisi quantitativa mostrata nel Grafico 8.

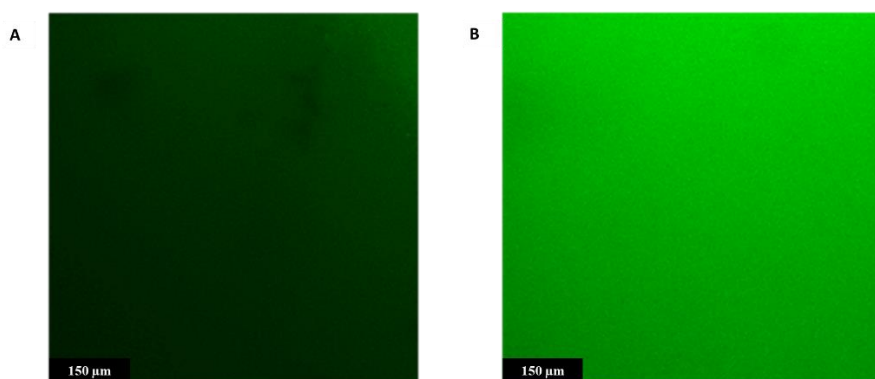


Figura 32: l'immagine mostra un'acquisizione al confocale effettuata su due idrogeli di collagene Il pannello A) mostra il collagene non funzionalizzato mentre il pannello B) mostra il collagene funzionalizzato con l'eparina. *Scale bar 150 µm.*

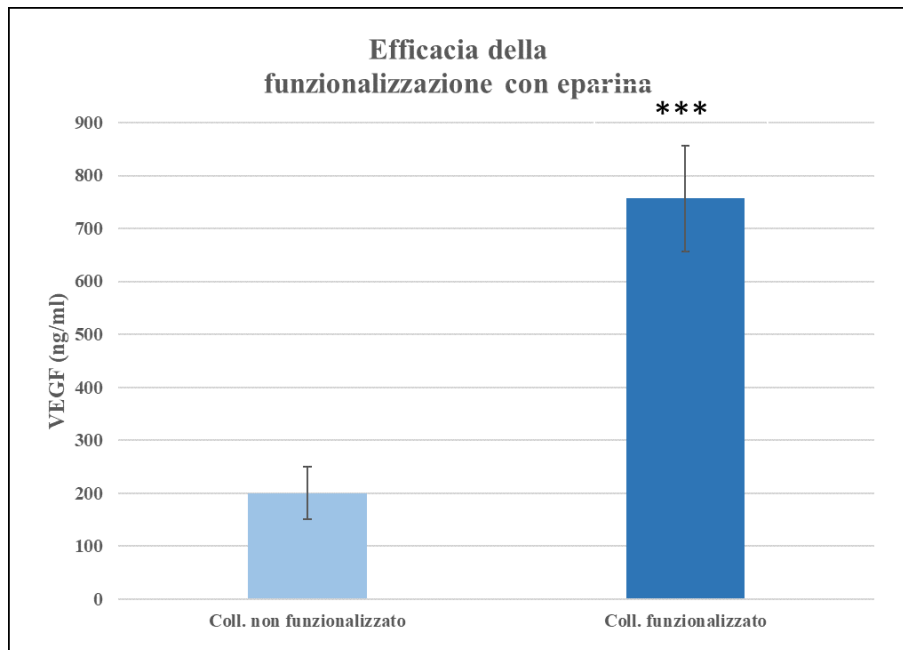


Grafico 8: il grafico mostra le concentrazioni di VEGF espresse in ng/ml adsorbite agli idrogeli di collagene testati. E' possibile evidenziare una notevole differenza tra la concentrazione di fattore riscontrata nel caso dell'idrogelo di collagene funzionalizzato con eparina rispetto a quella riscontrata nell'idrogelo di collagene impiegato come controllo, quindi non funzionalizzato (n=3). *P value* < 0,001 (***).

Per lo studio è stato impiegato un Ab coniugato con fluoresceina diretto verso il VEGF al fine di poter misurare la quantità di fattore adsorbita agli idrogeli di collagene attraverso la misurazione della fluorescenza misurata in RFU. Il risultato del confronto tra gli idrogeli del gruppo controllo, ossia non funzionalizzati, e quelli del gruppo trattato, quindi funzionalizzati con eparina ha mostrato che il protocollo di funzionalizzazione utilizzato era adatto allo scopo, in quanto la concentrazione di VEGF adsorbita agli idrogeli funzionalizzati è risultata di 757 ng/ml in confronto a quella rilevata per il gruppo controllo, corrispondente agli idrogeli di collagene non eparinizzato, che è risultata pari a 200 ng/ml.

5.5.2. Saggio di angiogenesi in piastra

I risultati degli esperimenti volti a testare l'adeguatezza della matrice di collagene nello stimolare la formazione di strutture pseudo-capillari, illustrati nella figura 33, hanno dimostrato che la matrice

prodotta era un substrato favorevole a stimolare la formazione di pseudo-capillari da parte delle cellule endoteliali a partire dalla sesta ora post-semina (A), come si può osservare anche dal dettaglio mostrato nella figura B.

Questo dato è rafforzato da quanto è stato osservato dopo 24 e 48 h dalla semina (C-E) quando la formazione di pseudo-capillari si è rivelata ancora più marcata (D-F).

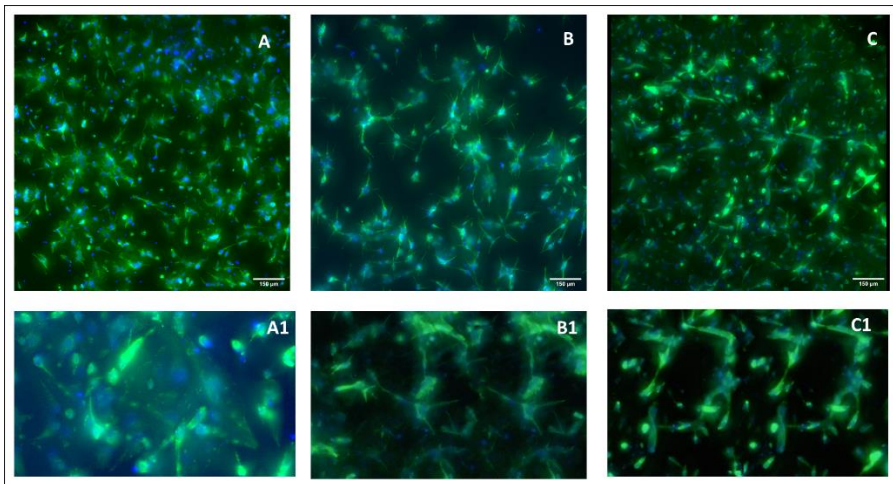


Figura 33: la figura mostra le cellule bEND all'interno della matrice di collagene/Matrigel. Nel pannello A sono mostrate le cellule dopo 6 ore di coltura, il cui aspetto, meglio evidenziato in A1 conferma l'adeguatezza della matrice alla formazione di pseudo-capillari. Questa caratteristica risulta ancor meglio visibile nei pannelli B e C, e nei dettagli in B1 e C1, che rappresentano rispettivamente il comportamento delle cellule a 24 e a 48 h di coltura (n=3). *Scale bar 150 µm.*

5.5.3. Caratterizzazione del gradiente di concentrazione generato all'interno del dispositivo di microfluidica

Nel corso delle diverse acquisizioni in *time-lapse* per valutare se la struttura del dispositivo fosse adatta a generare un gradiente di concentrazione di una molecola modello nel tempo e nello spazio, è stato possibile osservare che la diffusione della molecola inizia già dopo i primi 15 minuti di flusso ad una portata di 1 µl/min. Il valore della portata è stato selezionato per permettere alla matrice il minor stress possibile da flusso laminare. Poiché il tempo di diffusione di

una molecola è direttamente proporzionale al suo peso molecolare, oltre che alla concentrazione utilizzata per lo studio è stata utilizzato destrano coniugato con rodamina con peso molecolare di 40 kDa, analogo a quello del VEGF impiegato nei successivi esperimenti.

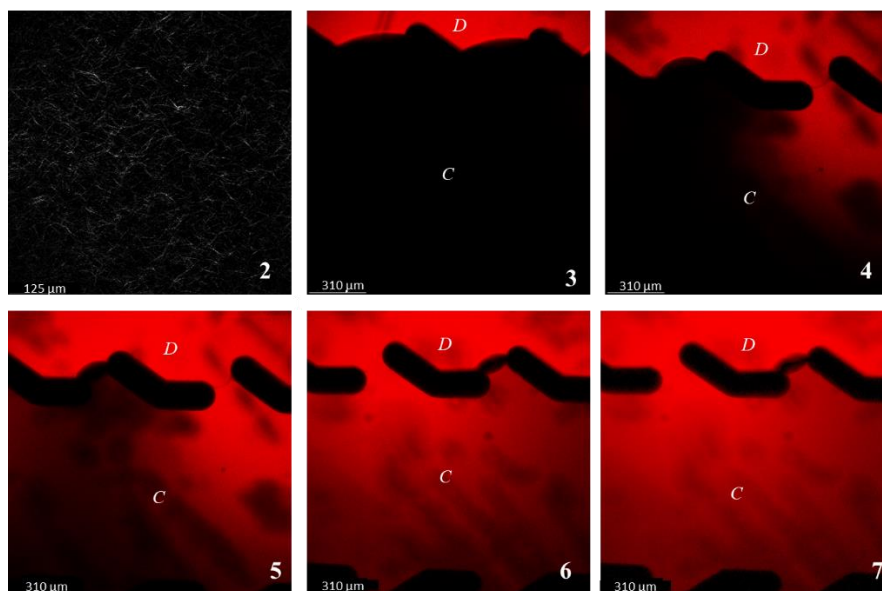


Figura 34: L'immagine mostra la diffusione osservata al confocale in *time-lapse* del destrano coniugato con rodamina all'interno della matrice di collagene/Matrigel. Il pannello 1 riporta un'acquisizione ottenuta con la tecnica di generazione della seconda armonica, il pannello 2 mostra il dispositivo al tempo 0, quindi prima dell'inizio della diffusione, mentre i pannelli successivi mostrano lo spostamento della molecola fluorescente all'interno della matrice dopo 15 (3), 30 (4), 60 (5) e 90 minuti (6).

Come si può osservare dalle immagini riportate nella Figura 34, la generazione del gradiente di destrano all'interno della matrice è iniziata dopo 15 minuti dall'attivazione del flusso per poi stabilizzarsi dopo ulteriori 75 minuti, quindi a 90 minuti dopo l'inizio della somministrazione (Fig. 32.2-6). Dall'analisi dei risultati ottenuti nel corso della standardizzazione della procedura è stato rilevato che 60 minuti corrisponde all'*endpoint* al quale si è stabilito un gradiente di concentrazione tale da consentire di misurare tre concentrazioni diverse contemporaneamente all'interno della matrice (Fig. 32.5).

Questo dato è confermato anche dai dati riportati nel Grafico 9, in cui viene mostrato l'andamento della curva di diffusione nel corso del

tempo valutata in base al parametro della fluorescenza, e nel Grafico 10 in cui sono state estratte le concentrazioni di destrano rodaminato all'interno della matrice a partire da una concentrazione di 200 $\mu\text{g/ml}$. Secondo i risultati mostrati sia nel Grafico 9 che nel Grafico 10, il gradiente inizia a formarsi già dopo 15 minuti di flusso. Man mano che il destrano diffonde all'interno della matrice si sviluppa un gradiente di concentrazione misurabile solo nelle prime due zone del dispositivo, quindi da 0 a 600 μm . In particolare, la prima concentrazione rilevata, quella più prossima alla fonte di erogazione del fattore, è risultata pari a 175 $\mu\text{g/ml}$, la seconda, ossia quella rilevata in posizione intermedia tra la fonte ed il punto più lontano da essa è risultata pari a 110 $\mu\text{g/ml}$ mentre la terza, misurata nel punto corrispondente all'estremo opposto rispetto alla fonte, è risultata pari a 50 $\mu\text{g/ml}$.

Dopo 60 minuti di flusso, invece è stato riscontrato un gradiente di concentrazione sviluppato in tutto il canale centrale, dato confermato anche dalla curva riportata nel Grafico 9. In questo caso la prima concentrazione è risultata pari a 150 $\mu\text{g/ml}$, la seconda pari a 110 e la terza pari a 75 $\mu\text{g/ml}$.

Dopo 90 minuti di erogazione invece, il gradiente di concentrazione non era più rilevabile in quanto i valori delle 3 concentrazioni all'interno della matrice erano simili, con un valore medio di 189 $\mu\text{g/ml}$.

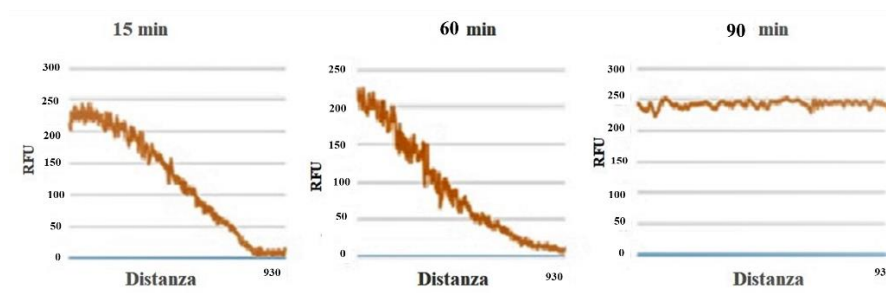


Grafico 9: i tre pannelli mostrano le curve di diffusione del destrano coniugato con rodamina all'interno della matrice di collagene/Matrigel posizionata nel canale centrale del dispositivo. Il destrano rodaminato è stato erogato alla concentrazione di 200 ng/ml con una portata di 1 $\mu\text{l/min}$. Le curve sono state ottenute misurando i

livelli di fluorescenza nel corso del tempo a partire dall'interno del canale laterale 1 (0 μm) fino al canale laterale 2 (930 μm).

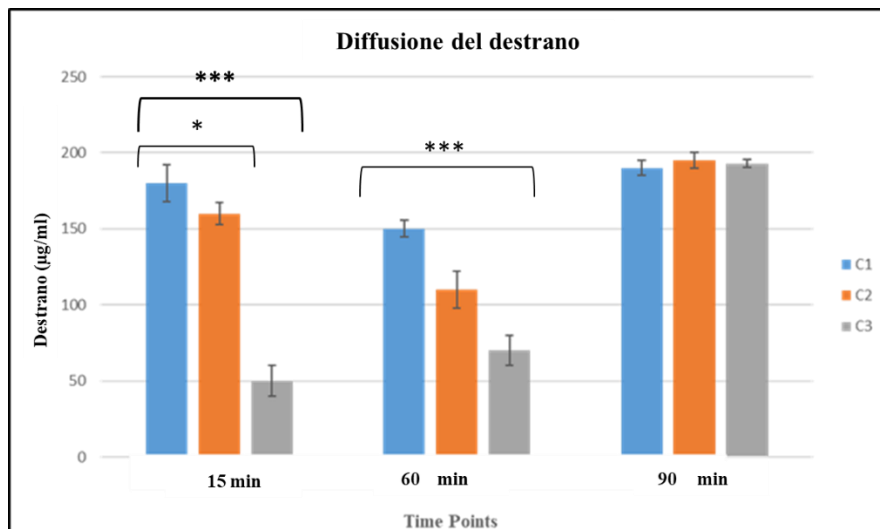


Grafico 10: il grafico mostra le concentrazioni di destrano rodaminato calcolate in base all'intensità di fluorescenza Relative Fluorescence Unit, a 15, 60 e 90 minuti dall'inizio del flusso. In legenda sono indicati con C1, C2 e C3 i canali laterale 1, centrale e laterale 2 rispettivamente (n=3). (*) P value < 0,05; (***) P value < 0,001.

5.5.4. Simulazione mediante software COMSOL

Come si può osservare dalla figura 35, che riporta il risultato dalla simulazione con il software COMSOL si evidenzia una variazione di colore a livello del canale centrale. Analizzando i colori della scala graduata, si rileva che le concentrazioni nel canale centrale partono da una prima concentrazione che si aggira intorno allo $0.4 \text{ nmol}/\mu\text{m}^3$, per poi passare ad una seconda concentrazione intorno allo $0.3 \mu\text{mol}/\text{mm}^3$ e quindi ad una terza concentrazione pari a $0.18 \mu\text{mol}/\text{mm}^3$. Quindi come migliore time-point è stato scelto 3 h, in quanto corrisponde al

tempo necessaria per la formazione del gradiente di concentrazione.

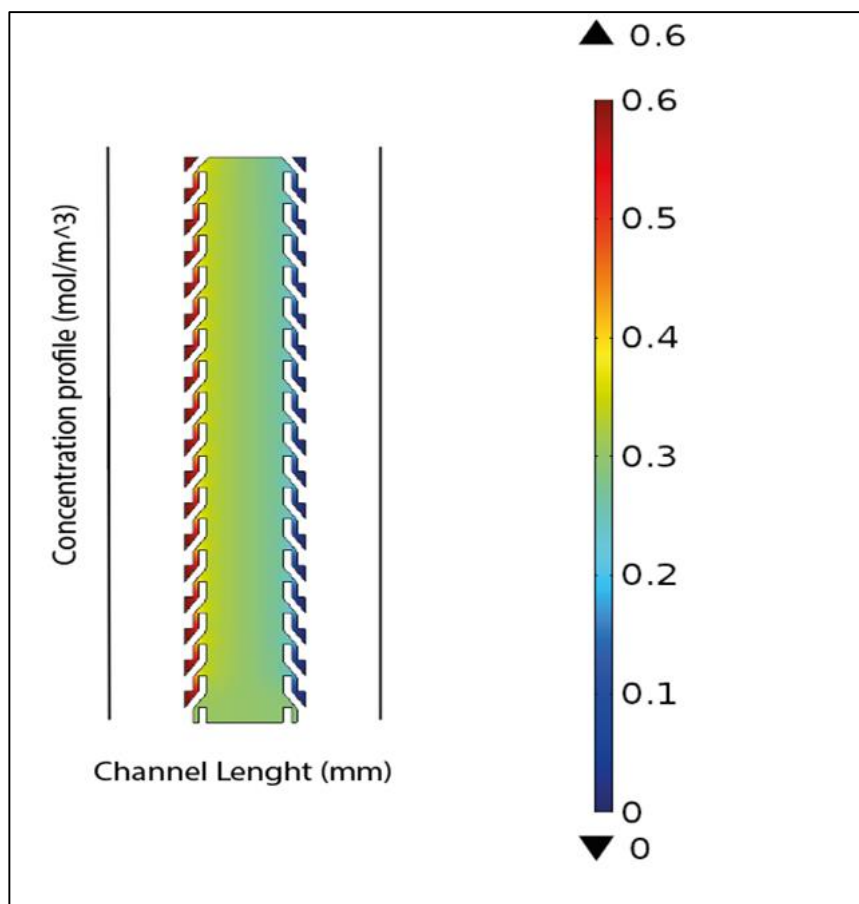


Figura 35: L'immagine mostra il profilo di concentrazione stabilitosi dopo 3 h di flusso restituito dal *software* COMSOL. Da destra verso sinistra si passa dalla concentrazione maggiore alla concentrazione minore.

5.5.5. Studio del gradiente di concentrazione di VEGF all'interno del dispositivo di microfluidica

Come si può notare dall'osservazione della figura 36, dopo 3 h di diffusione si evidenzia l'instaurarsi di un gradiente di VEGF all'interno del dispositivo. Il risultato è riportato nel grafico 11 che mostra la curva delle intensità di fluorescenza. Nel grafico 12 invece, sulla base delle intensità sono state estratte le concentrazioni di nostro interesse.

I risultati in termini di concentrazioni sono risultati in linea con quelli ottenuti dalla simulazione effettuata mediante il *software* COMSOL. Infatti, la prima concentrazione che è stata riscontrata dallo studio del gradiente di concentrazione è risultata pari a 40 ng/ml, la seconda a 29

ng/ml e la terza a 18 ng/ml mentre i risultati restituiti dal *software*, sono stati rispettivamente di 42, 29 e 18 ng/ml.

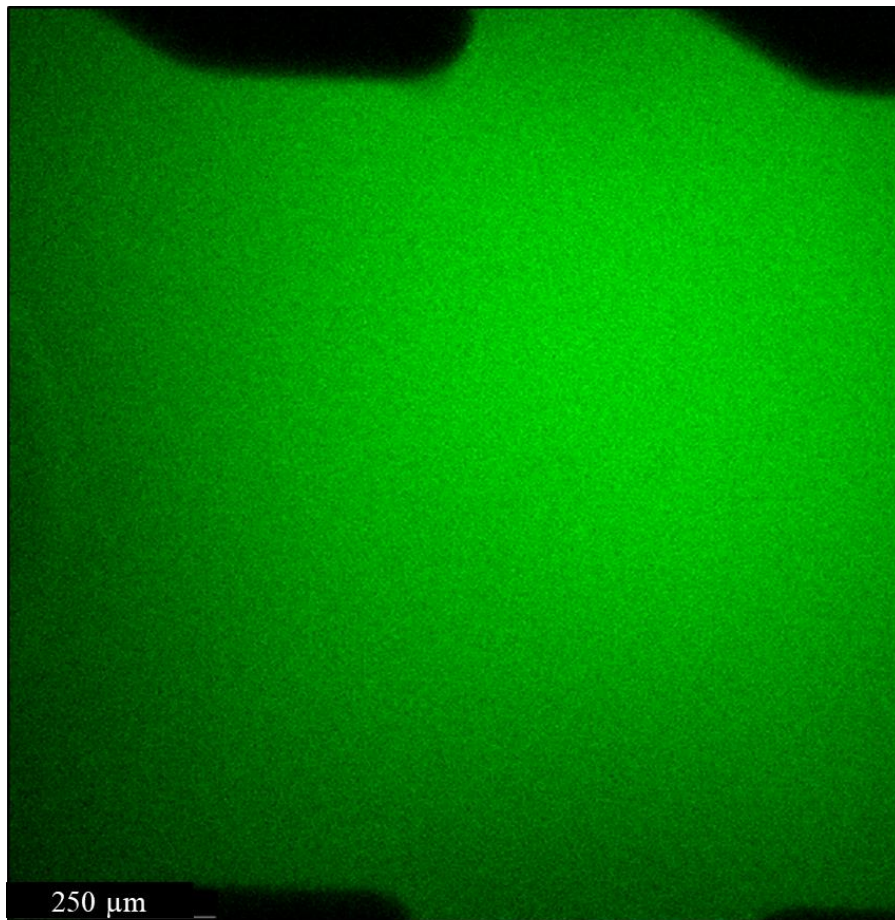


Figura 36: l'immagine mostra un'acquisizione effettuata al microscopio confocale del canale centrale del dispositivo, contenente la matrice di collagene/Matrigel, all'interno del quale ha diffuso il VEGF, caricato alla concentrazione di 60ng/ml all'interno della soluzione immessa nel canale laterale 1. La presenza del fattore è stata rilevata tramite un anticorpo Anti-VEGF coniugato con il fluoroforo Alexa Fluor 647 (n=3).

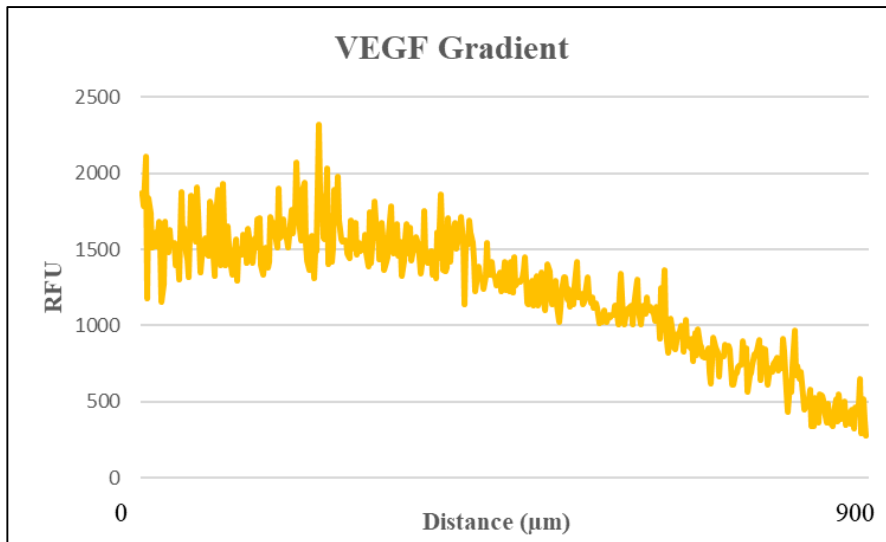


Grafico 11: Il grafico riporta l'andamento del gradiente di concentrazione di VEGF lungo l'asse trasversale del canale centrale del dispositivo dopo 3 h di diffusione. In base all'intensità di fluorescenza (RFU) è stata estratta la curva di diffusione, come nel caso del destrano, a partire dal canale laterale 1 (0) fino ad arrivare alla fine del canale centrale, in posizione, quindi, adiacente al canale laterale 2 (900 µm).

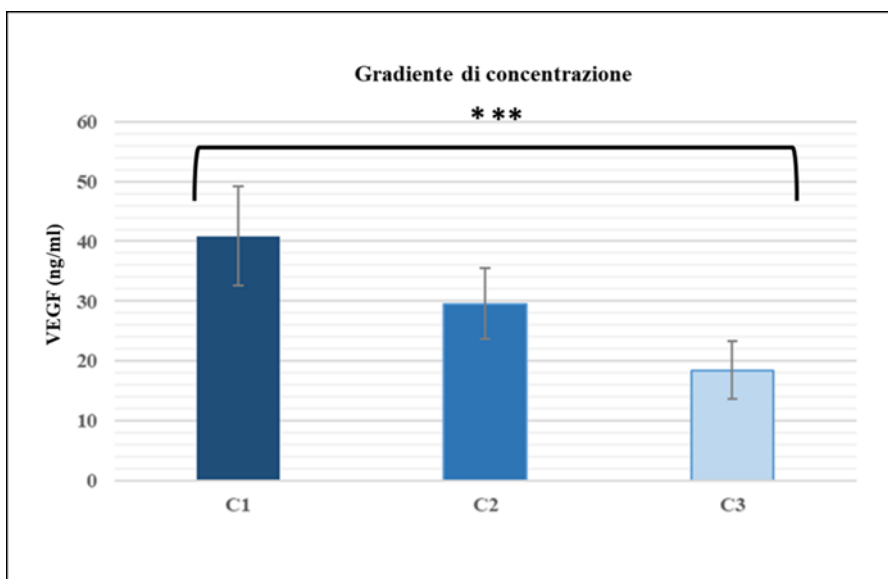


Grafico 12: il grafico mostra le concentrazioni, estratte sulla base dell'intensità di fluorescenza (RFU), di VEGF diffuso all'interno del canale centrale. Le tre concentrazioni rilevate sono in linea con i risultati ottenuti dalla simulazione con il software COMSOL che ha restituito valori di 42, 29 e 18 ng/ml (n=3). *P value* < 0,001.

5.5.6. Studio dell'effetto del gradiente di concentrazione di VEGF su cellule bEND

Come riportato nella figura 37 a 6 h (C) dall'analisi al microscopio confocale si inizia ad osservare una formazione iniziale di pseudo-capillari che diventa più evidente a 48 h (B). A tempo 0 (A), quindi prima dell'inizio della stimolazione con il VEGF, è possibile notare che si iniziano formare le prime strutture pseudo-tubulari, in virtù delle caratteristiche biologiche della matrice in particolare per la presenza del Matrigel all'interno di essa. Tale sostanza è ricca di numerosi fattori di crescita che svolgono un effetto di stimolazione della tubulogenesi sulle cellule endoteliali.

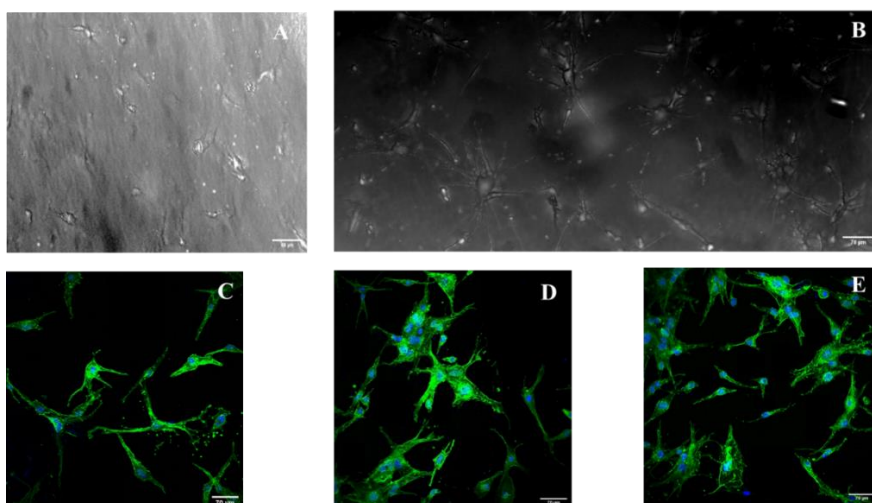


Figura 37: l'immagine mostra le cellule bEND coltivate all'interno del dispositivo a T0, quindi prima di iniziare la stimolazione con il VEGF (A), e dopo 6 h (C), 24 (D) e 48 h di stimolazione (B) ed (E).

In (A) e (B) sono visibili le immagini in luce trasmessa mentre in (C), (D) ed (E) sono riportate le immagini in fluorescenza. *Scale bars* (A) 65 μm , (B, C, D ed E) 70 μm

5.5.7. Studio dell'effetto di un gradiente di concentrazione di VEGF su cellule HUVEC

Analizzando i risultati ottenuti dagli esperimenti di stimolazione delle cellule HUVEC all'interno del dispositivo caricato con il VEGF alla

concentrazione di 60 ng/ml, è stato possibile osservare che dopo 6 ore di diffusione (B) si rilevava una lieve reazione da parte della cellule, in quanto si è osservata la presenza di strutture pseudo-tubulari solo in alcuni punti del canale centrale mentre dopo 24 h (C) di stimolazione si sono potute osservare delle vere e proprie strutture pseudo-capillari (Fig.38). Tali strutture non erano, tuttavia, presenti lungo tutto il canale centrale ma sono risultate evidenziabili soprattutto o in prossimità del canale laterale 1, ossia della fonte dalla quale il fattore diffondeva all'interno della matrice. Questo fenomeno è riconducibile al fatto che le cellule sono state sottoposte ad una stimolazione maggiore, con una prima concentrazione pari a 43 ng/ml, rispetto alle successive concentrazioni, quindi 29 e 18 ng/ml. Man mano che la concentrazione diminuiva, quindi lungo l'asse trasversale del dispositivo, man mano che ci si spostava dalla fonte, l'effetto è diminuito gradualmente. Al fine di mostrare l'ottimale organizzazione delle fibre della matrice di collagene/Matrigel nel costituire un *milieu* adeguato a garantire il benessere cellulare è stata impiegata la tecnica della generazione della seconda armonica che ha confermato una struttura omogenea e regolare della matrice (A).

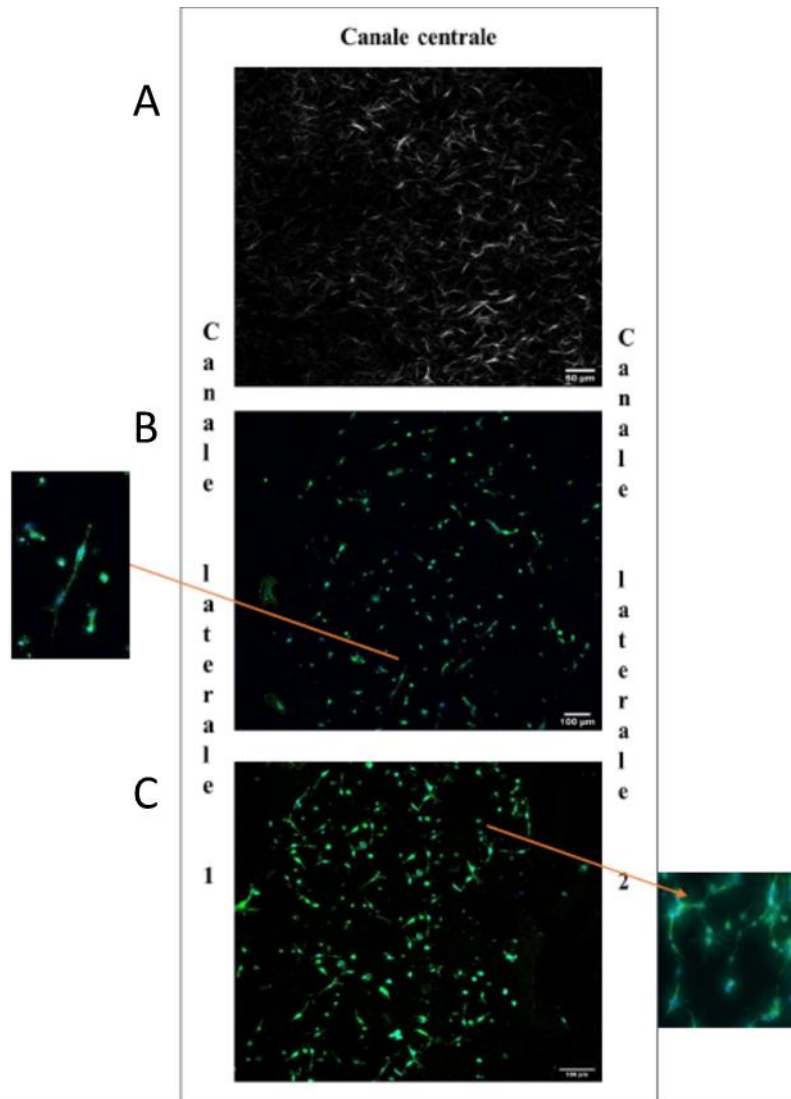


Figura 38: l'immagine mostra le cellule HUVEC all'interno del canale centrale del dispositivo. In (A) l'immagine corrisponde all'idrogel di Matrigel/collagene osservato con la tecnica di generazione della seconda armonica. In (B) si possono osservare le cellule all'interno del dispositivo dopo 6 ore di stimolazione con, nel riquadro del dettaglio, due cellule allungate in procinto di formare strutture pseudo-capillari. In (C) sono visibili le cellule all'interno del canale dopo 24 ore di stimolazione, nel riquadro del dettaglio si nota la caratteristica disposizione delle cellule a formare strutture pseudo-capillari. *Scale bars* (A) 60 μm , B e C (100 μm).

Capitolo 6

6.1 Discussione

Il *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), noto anche come fattore di permeabilità vascolare (VPF), è stato originariamente descritto come un marcatore specifico delle cellule endoteliali. Tuttavia, esso è secreto da molteplici tipologie di cellule comprese le cellule tumorali, i macrofagi, le piastrine, i cheratinociti, e le cellule mesangiali renali (Ferrara et al., 2016).

Il VEGF svolge un ruolo importante nelle normali funzioni fisiologiche quali la formazione dei tessuti, l'emopoiesi, la guarigione delle ferite e, naturalmente, lo sviluppo.

Per questo motivo, tale fattore è utilizzato ampiamente nell'ambito dell'ingegneria dei tessuti allo scopo di ottenere un miglioramento, in termini di celerità e di adeguatezza, dei processi di rigenerazione tissutale (Oliveira et al., 2021).

In particolare, al fine di supportare il processo angiogenico, l'ingegneria dei tessuti si basa sull'utilizzo di diverse tipologie di *scaffolds*, costruiti in grado di indurre il rilascio di molecole pro-angiogeniche (Khojasteh et al., 2013).

Fattori di crescita, come per esempio il VEGF, vengono incorporati all'interno degli *scaffolds* in modo da ottenere un rilascio prolungato del fattore nel tessuto circostante (Oliveira et al., 2021).

Le diverse strategie adottate per ottenere un rilascio graduale e prolungato di una molecola all'interno del tessuto ospite si avvalgono dell'utilizzo di architetture in grado di mimare la struttura della matrice extra-cellulare (Yang et al., 2015).

In questo contesto, è fondamentale che lo *scaffold* risponda a specifiche esigenze sia in relazione al materiale selezionato che in termini di struttura realizzata. In base alla strategia attraverso la quale si intende guidare il processo rigenerativo, le tipologie di *scaffolds* sono principalmente due: costruiti cellularizzati e costruiti non cellularizzati. Nel primo caso si tratta di un approccio che punta sulla componente

cellulare integrata all'interno dello *scaffold* che viene, appunto, seminato con specifiche linee cellulari prima di essere impiantato nel sito danneggiato. Nel secondo caso, diversamente, si tratta di una strategia *in situ* in cui lo *scaffold* privo di cellule viene impiantato nel distretto anatomico danneggiato innescando, come primo evento, il reclutamento cellulare e, a seguire, i meccanismi propri della cascata rigenerativa.

Lo sviluppo di una rete vascolare fisiologicamente matura all'interno di un costrutto impiantato è un fattore chiave affinché la formazione del tessuto neoformato all'interno dell'organismo ospite sia corretta e funzionale (Mazio et al., 2019).

Il progetto CASCADE si basa sulla creazione di uno *scaffold* creato con un approccio definito *bottom-up*, ossia basato sull'utilizzo di singoli elementi, *building blocks*, micro-moduli che, opportunamente assemblati, consentono di ottenere una struttura estremamente versatile all'interno della quale le particelle caricate con fattori di crescita possono essere posizionate in maniera tanto esatta quanto libera, laddove per libera si intende suscettibile di essere modificata senza alterare la struttura del costrutto. Tale scelta è stata giustificata dai numerosi studi in cui è stato osservato che un approccio simile tende ad aumentare notevolmente la possibilità di modulare più processi fisiologici in un determinato arco di tempo (Kang et al., 2011).

È stato, inoltre, osservato che una porosità prestabilita ottimale dello *scaffold* può essere ottenuta basandosi su un compromesso secondo il quale il costrutto dovrebbe non solo permettere l'infiltrazione del tessuto ospite ma anche resistere alle sollecitazioni meccaniche a cui esso è sottoposto.

Inoltre, l'assemblaggio di elementi costitutivi dello *scaffold* ottenuto attraverso questo tipo di approccio migliora la risposta biologica del tessuto ospite, accelerandone la rigenerazione. Tale risposta può essere ulteriormente potenziata creando un gradiente di concentrazione di fattori di crescita vascolare che determinino la formazione di una rete organizzata e funzionale che assicuri il buon esito del processo.

In questa tesi di dottorato, abbiamo fornito gli spunti per la creazione di uno *scaffold* in grado di rilasciare una concentrazione graduale di VEGF volta ad innescare un'angiogenesi controllata a partire dal costruito. La strategia si basa sulla possibilità da parte dello *scaffold* di reclutare cellule progenitrici endoteliali, oltre ad indurre l'angiogenesi per *sprouting* a partire dai vasi circostanti al fine di indurre la rigenerazione del tessuto danneggiato in modo efficace.

L'idea è fare in modo che le cellule endoteliali, una volta penetrate all'interno del costruito, seguano il gradiente creato all'interno dello *scaffold* formando vasi sanguigni secondo una traiettoria definita dalla disposizione precisa e controllata delle microsfele contenenti concentrazioni decrescenti di VEGF. Secondo questo tipo di organizzazione le microsfele caricate con concentrazioni maggiori, disposte alla periferia dello *scaffold*, svolgono la funzione di determinare l'effetto biologico del reclutamento cellulare, mentre quelle caricate con concentrazioni minori, disposte all'interno dello *scaffold*, svolgono la funzione di stabilizzare i vasi neoformati.

Ciò comporta poi una serie di meccanismi a cascata che, attraverso il reclutamento e la proliferazione cellulare, la stabilizzazione della rete vascolare neoformata e la conseguente penetrazione del tessuto in via di sviluppo all'interno del costruito, porteranno ad ottenere un tessuto completo e funzionale.

Allo scopo di fornire informazioni adeguate relativamente alle concentrazioni da incapsulare all'interno delle microsfele deposito integrate nello *scaffold*, sono stati portati avanti esperimenti sia *in vitro* che *in vivo* su modello murino.

In primo luogo, tramite un dispositivo di microfluidica, partendo da una concentrazione nota, siamo riusciti ad ottenere un dato quantitativo relativo al VEGF all'interno di una matrice tridimensionale in cui si è instaurato un gradiente di concentrazione. Attraverso l'impiego di questo dispositivo abbiamo potuto osservare che le cellule endoteliali, quando stimolate attraverso la creazione di un gradiente, reagivano seguendo un *pattern* di tubulogenesi qualitativamente differente nelle diverse aree del dispositivo in relazione al fatto che effettivamente nei

diversi punti la stimolazione veniva esercitata da concentrazioni diverse nell'ambito della stessa matrice.

Seguendo il proposito di traslare *in vivo* quanto osservato *in vitro*, stiamo attualmente lavorando alla fabbricazione di uno *scaffold* con microarchitettura e porosità controllate, come descritto, da caricare con microparticelle contenenti le concentrazioni di VEGF identificate attraverso l'impiego del dispositivo.

Il fine ultimo del progetto è, infatti, utilizzare lo *scaffold* fabbricato seguendo il percorso illustrato nell'ambito di questa tesi per il trattamento di difetti ossei di dimensioni critiche. A questo scopo intendiamo impiegare, oltre al VEGF, anche un fattore volto a stimolare nello specifico il processo di rigenerazione ossea come il *Bone Morphogenetic Protein* (BMP). In questo modo, le cellule endoteliali reclutate dal VEGF innescerebbero il processo angiogenico mentre, successivamente, il BMP richiamerebbe le cellule staminali mesenchimali atte alla neoformazione del tessuto osseo.

Inoltre, la scelta di utilizzare un dispositivo di microfluidica, volto alla creazione di uno *scaffold* "ottimizzato", potrebbe fungere da stimolo per successivi lavori ispirati al principio delle 3R (*Reduction, Refinement and Replacement*), in particolare al *Refinement* e, potenzialmente, al *Replacement* (Russel *et al.*, 1959). Questo in quanto la razionalizzazione del processo di fabbricazione consente di impiegare un minore numero di animali da laboratorio, applicando in pieno le direttive dettate dal D.Lgs n. 26 del 2014 in materia di benessere degli animali da laboratorio ed ispirato, appunto, al rispetto del principio delle 3R.

L'approccio basato sull'impiego di dispositivi di microfluidica che sostituiscano in parte gli studi preclinici basati sull'impiego di organismi modello, si è sviluppato notevolmente nel corso degli ultimi dieci anni.

In una review pubblicata nel 2020, Low ed i suoi collaboratori hanno argomentato ampiamente l'utilizzo dei cosiddetti *Organ on a chip* (OoC), noti anche come sistemi microfisiologici o "tessuti su chip". Tali dispositivi hanno suscitato un interesse sostanziale negli ultimi

anni grazie al rilevante ruolo applicativo negli studi di farmacocinetica nonché nell'ambito della medicina personalizzata.

Anche l'utilizzo degli OoC, attualmente al centro di notevoli progressi, così come il presente lavoro di tesi, si inserisce nel contesto di un approccio multidisciplinare, basato su competenze variegate, che punta a realizzare soluzioni innovative traslabili attraverso i diversi campi di interesse che ad esso danno vita.

6.2. Bibliografia

1. N. Ferrara, A.P Adamis Ten years of anti-vascular endothelial growth factor therapy. *Nat Rev Drug Discov* (2016) 15:385–403
2. É. R. Oliveira , L. Nie, D. Podstawczyk, A. Allahbakhsh, J. Ratnayake , D. L. Brasil and A. Shavandi Advances in Growth Factor Delivery for Bone Tissue Engineering *Int. J. Mol. Sci.* (2021), 22, 903
3. A. Khojasteh, H. Behnia, N. Naghdi, M. Esmaeelinejad,; Z. Alikhassy, M. Stevens Effects of different growth factors and carriers on bone regeneration: A systematic review. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.* (2013) 116, e405–e423
4. N. J. Yang and M. J. Hinner Getting Across the Cell Membrane: An Overview for Small Molecules, Peptides, and Proteins *Methods Mol Biol.* 2015 ; 1266: 29–53
5. C. Mazio, C. Casale, G. Imparato, F. Urciuolo, C. Attanasio, M. De Gregorio, F. Rescigno, P. A. Netti, Pre-vascularized dermis model for fast and functional anastomosis with host vasculature *Biomaterials* (2019) 192 159–170
6. Y. Kang, S. Kim, A. Khademhosseini, Y. Yang Creation of bony microenvironment with CaP and cell-derived ECM to enhance human bone-marrow MSC behavior and delivery of BMP-2. *Biomaterials* (2011); 32:6119-6130
7. L. A. Low , C. Mummery, B. R. Berridge, C.P. Austin and D.A. Tagle Organs- on- chips: into the next decade *Nature Review Drug discovery* (2020)
8. W.M.S. Russell and R.L. Burch, *The principles of humane experimental technique* (1959)