



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**



**DIPARTIMENTO
DI INGEGNERIA
DELL'INFORMAZIONE**

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

**INGEGNERIA TISSUTALE PER LO SVILUPPO DI VASI SANGUIGNI
ARTIFICIALI**

Relatore: Prof.ssa Silvia Todros

Laureanda: Giada Ferro

ANNO ACCADEMICO 2021 – 2022

Data di laurea 19 luglio 2022

INDICE

Abstract	5
Introduzione	7
Cap. 1 Vasi sanguigni e costrutti ingegnerizzati	
1.1 Introduzione al sistema cardiovascolare e alla struttura dei vasi	9
1.2 Tipologie di vasi	10
1.3 Considerazioni generali sui vasi sanguigni ingegnerizzati	12
1.4 Tipologie cellulari	13
1.4.1 Cellule vascolari autologhe	13
1.4.2 Cellule staminali embrionali	14
1.4.3 Cellule staminali mesenchimali	14
1.4.4 Cellule progenitrici	15
1.4.5 Cellule staminali pluripotenti indotte	15
1.4.6 Accenni su semina e maturazione	16
1.5 Fattori biochimici	17
Cap. 2 Approcci e materiali per lo sviluppo di vasi sanguigni ingegnerizzati	
2.1 Approccio scaffold-based	20
2.1.1 Scaffold decellularizzati	20
2.1.2 Scaffold naturali	21
2.1.3 Scaffold sintetici	23
2.2 Approccio scaffold-free	26
Cap. 3 Tecniche di produzione	
3.1 Additive Manufacturing - stampa 3D	27
3.1.1 Additive Manufacturing per l'approccio scaffold-based	28
3.1.2 Additive Manufacturing per l'approccio scaffold-free	28
3.1.3 Tecnologie di Additive Manufacturing	30
3.2 Electrospinning	33
3.2.1 Solution electrospinning	33
3.2.2 Melt electrowriting	35
Conclusioni	37
Bibliografia e sitografia	38

ABSTRACT

In questa sede si intende presentare e riassumere le innovazioni nel campo dell'ingegneria tissutale applicata agli innesti vascolari con particolare riguardo ai materiali utilizzati per le strutture di supporto e alle relative tecniche di produzione.

La tesina si aprirà con una presentazione delle tipologie di vasi sanguigni a cui si uniscono dei richiami al sistema circolatorio e alle relative problematiche alle quali l'ingegneria tissutale intende offrire soluzione.

Verranno descritte le caratteristiche richieste ai tessuti ingegnerizzati, sia dal punto di vista meccanico che biochimico, con un accenno alle cellule coinvolte e all'utilizzo di fattori biochimici per promuoverne la crescita e l'adesione.

Successivamente verranno descritti i diversi approcci allo sviluppo dei vasi sanguigni artificiali, ponendo particolare attenzione ai materiali utilizzati per gli *scaffold*, siano essi naturali o sintetici, analizzandone per ognuno vantaggi e svantaggi.

Infine, verranno presentate le principali tecniche di produzione a partire dall'*Additive Manufacturing* (AM), o stampa 3D, con le sue diverse declinazioni basate sui processi di estrusione o laser, per poi passare agli sviluppi più recenti offerti dall'elettrofilatura (*electrospinning*), sia per soluzione (*solution electrospinning*) sia per fusione (*melt electrowriting*).

INTRODUZIONE

Con il generale incremento dell'aspettativa di vita si è osservata una sempre più larga diffusione di patologie cardiovascolari dovute all'età e collegate all'arteriosclerosi, come la cardiopatia ischemica, l'arteriopatia periferica e l'infarto miocardico.

Nonostante gli sforzi per ridurre lo sviluppo di tali patologie attraverso campagne di sensibilizzazione volte a incentivare uno stile di vita sano e l'uso di farmaci per la prevenzione primaria, esse restano la principale causa di mortalità nel mondo. Pertanto, la ricerca nell'ambito della rifunionalizzazione di vasi sanguigni danneggiati o occlusi ha assunto sempre maggior rilevanza dopo il primo tentativo, risalente al 1906, di sostituire un vaso compromesso con una vena ricavata dallo stesso paziente. [1]

Recentemente alle tecniche tradizionali si è affiancata una nuova disciplina, l'ingegneria tissutale, che si propone di offrire una soluzione alle principali problematiche collegate alle attuali terapie di rivascularizzazione.

Queste ultime, infatti, richiedono l'utilizzo di vasi autologhi sani, come la vena safena o le arterie toraciche interne, dei quali il paziente potrebbe non essere a disposizione a causa di fattori come diabete o altre malattie dell'apparato cardiovascolare. Inoltre, anche quando tale procedura sia perseguibile, essa risulta molto invasiva e comunque imperfetta. Basti pensare che la percentuale di fallimento delle protesi che fanno uso della vena safena, le più comunemente utilizzate per il bypass delle arterie coronarie, raggiunge il 25% nei primi 12-18 mesi dopo l'operazione [1].

Per questi motivi, le attuali strategie cliniche comprendono anche l'uso di condotti sintetici in materiali come il Dacron® (polietilene tereftalato (PET)) o il Teflon® (politetrafluoroetilene espanso (ePTFE)). Tuttavia i materiali sintetici, oltre a mancare delle capacità di rimodellarsi e crescere che li rendono inadatti all'uso sulla popolazione pediatrica, risultano utilizzabili solamente per lo sviluppo di vasi di diametro superiore ai 6 mm [2]. Nei vasi sintetici di dimensioni inferiori insorgono problematiche legate principalmente a infezioni, trombosi, iperplasia intima, calcificazione e formazione di aneurismi che portano al fallimento della protesi generalmente entro tre anni dall'impianto [2].

Ne consegue una crescente domanda di condotti vascolari provenienti da fonti alternative, alla quale l'ingegneria tissutale offre una possibile risposta grazie alle sue tecniche che permettono di prelevare cellule autologhe o staminali, coltivarle in determinati bioreattori per poi seminarle su apposite strutture di supporto (*scaffold*) per la ricostruzione del vaso sanguigno.

La capacità di costruire vasi sanguigni ingegnerizzati è inoltre collegata al problema della vascolarizzazione di tessuti artificiali spessi, che sta alla base della possibilità di produrre organi artificiali in grado di sopperire alla discrepanza tra il numero di pazienti che necessitano di un trapianto e la disponibilità di donatori compatibili. Senza condotti vascolari, infatti, le cellule possono operare scambi solo a corto raggio, tramite diffusione. Pertanto, per sopravvivere e mantenere la sua funzionalità ogni cellula non può che trovarsi entro i 100-200 μm di distanza da un capillare, in relazione al tipo di tessuto in esame [1].

Data l'importanza di suddette strutture, l'intento di questa tesi è quello di presentare uno sguardo d'insieme sulle attuali tecniche dell'ingegneria tissutale e su quali sono le sfide collegate alla produzione di vasi sanguigni ingegnerizzati e alla valutazione della loro effettiva applicabilità in vivo.

Come si può facilmente intendere, l'obiettivo dell'ingegneria tissutale è di riprodurre il più fedelmente possibile la composizione dei tessuti nativi per mimarne la funzionalità attraverso la scelta della miglior combinazione di materiali di supporto, cellule, fattori biochimici e stimoli esterni. La principale sfida collegata a tale obiettivo è insita nello sviluppo di un vaso artificiale dotato di tutti gli strati che compongono il suo corrispettivo naturale, mantenendo al contempo la funzionalità cellulare. Tale compito è reso ancor più difficoltoso dalla disposizione concentrica di tali strati e dall'eterogeneità del sistema vascolare umano, pure sottoposto a una varietà di sforzi derivanti dal moto pulsatile del sangue pompato dal cuore.

Appare, quindi, evidente la necessità di aprire questa tesi investigando l'anatomia e la fisiologia del sistema cardiovascolare, così da ricavarne una miglior comprensione della complessità che concerne lo sviluppo di vasi sanguigni artificiali e dell'origine di determinati requisiti ad essi imposti.

CAPITOLO 1

VASI SANGUIGNI E COSTRUTTI INGEGNERIZZATI

1.1 INTRODUZIONE AL SISTEMA CARDIOVASCOLARE E ALLA STRUTTURA DEI VASI

Il sistema cardiovascolare è la rete di trasporto di nutrienti, ossigeno, ormoni e altri tipi di cellule come quelle del sistema immunitario. Interviene nella regolazione del pH e della temperatura, oltre che della pressione osmotica e di quella sanguigna e più in generale nel mantenimento dell'omeostasi corporea. È costituito dal cuore e da 5 diversi tipi di vasi sanguigni, presentati di seguito, che si differenziano per dimensioni, funzione e composizione (Fig. 1).

Una distinzione primaria può essere operata sulla base della tipologia di sangue trasportato e sulla direzione del flusso. Con eccezione della circolazione polmonare, arterie e arteriole trasportano il sangue ossigenato ricco di nutrienti dal cuore agli organi, laddove i capillari operano gli scambi metabolici con i tessuti, mentre venule e vene riportano al cuore il sangue deossigenato e ricco di cataboliti.

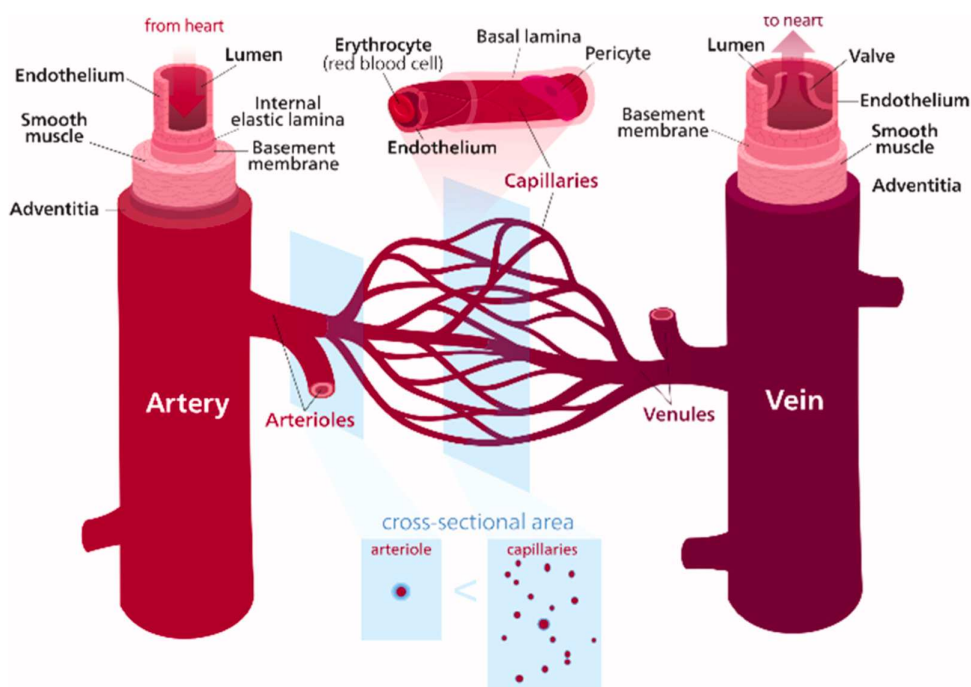


Fig. 1 Vasi sanguigni e loro composizione [3]

I vasi possono essere costituiti da tre strati di diversa composizione: tonaca intima, tonaca media e tonaca avventizia (Fig. 1).

La combinazione delle tre tonache che compongono i vasi sanguigni serve ad assicurare che essi abbiano le giuste proprietà meccaniche per resistere e propagare le forze a cui sono sottoposti, ovvero per sostenere il flusso e la pressione sanguigna.

La tonaca intima è lo strato adibito alla regolazione del flusso sanguigno e a prevenire la coagulazione. Essa è composta dall'endotelio, che delimita il lume dei vasi ed è a contatto diretto col sangue, e dalla lamina basale, una membrana di matrice extra cellulare (tessuto connettivo secreto dalle cellule epiteliali costituito da laminina e collagene) alla quale è ancorato. Nelle arterie vi è, inoltre, una lamina elastica, assente nelle vene [4].

La tonaca media garantisce il mantenimento della pressione sanguigna in quanto è composta da cellule muscolari lisce ed elastina, che la rendono capace di operare i meccanismi di vasocostrizione e vasodilatazione [4]. Tali cellule muscolari agiscono in risposta a specifici segnali che indicano che la pressione sanguigna è fuori dai valori fisiologici o che c'è la necessità di un maggior afflusso di sangue in una determinata area del corpo. Esse possono quindi contrarsi o rilassarsi andando a variare il diametro dei vasi e di conseguenza modificando drasticamente la resistenza al flusso sanguigno.

La tonaca avventizia, assente nei capillari, è costituita prevalentemente da tessuto connettivo fibroso e in quanto strato più esterno ha la funzione di proteggere il vaso e garantirne l'aderenza ai tessuti circostanti [4].

1.2 TIPOLOGIE DI VASI

I vasi sanguigni possono essere suddivisi principalmente in cinque tipologie: arterie, arteriole, capillari, venule e vene.

Le arterie, essendo composte da tutte e tre le tonache, hanno pareti spesse, rese piuttosto rigide dal tessuto connettivo fibroso, per cui è necessaria molta energia proveniente dalla contrazione ventricolare per distenderle. Tale energia viene poi restituita durante il ritorno elastico permettendoci l'avanzamento dell'onda pressoria. In tal senso le arterie costituiscono una riserva di pressione.

Dalle arterie più elastiche e più vicine al cuore, caratterizzate da un diametro interno medio di 15 mm con pareti dello spessore dell'ordine di 1 mm, il sangue passa alle arterie muscolari il cui lume si riduce ai 6 mm di diametro [1].

Da queste il sangue passa ad arterie via via più piccole fino a giungere alle arteriole, vasi con un diametro interno di circa $37\ \mu\text{m}$ e con pareti dello spessore di $6\ \mu\text{m}$ [5]. Esse rappresentano il punto di massima resistenza al flusso sanguigno. La loro parete infatti è meno elastica ed è costituita soprattutto da muscolatura liscia, che le rende punti di resistenza variabile capaci di regolare il flusso sanguigno costringendosi e dilatandosi. Tale modulazione del diametro delle arteriole è regolata da molti fattori, tra cui, sistema nervoso autonomo, ormoni, e concentrazione di ossigeno nei tessuti.

Dalle arteriole il sangue giunge ai tessuti attraverso i capillari. In quanto punto di scambio, essi sono costituiti dalla sola tonaca intima. Le loro pareti pertanto non presentano né muscolatura liscia né tessuto elastico o fibroso così da facilitare gli scambi di gas, nutrienti e prodotti di scarto. Il singolo strato di cellule endoteliali regola il flusso di tali sostanze dal lume dei vasi ai tessuti e viceversa, mentre la lamina basale mantiene il lume stesso impedendo alle cellule dell'endotelio di collassare.

Con un lume dal diametro medio di $9\ \mu\text{m}$ e spessore delle pareti di $0.5\ \mu\text{m}$, i capillari sono i vasi più sottili [1]. Si distinguono in due tipologie: continui e fenestrati. Nei primi le cellule epiteliali formano uno strato continuo permettendo solamente la diffusione molecole piccole come ioni e H_2O . Nei secondi, l'epitelio presenta pori del diametro di $60\text{-}80\ \text{nm}$ che permettono il passaggio anche di molecole più grandi come alcune proteine [1].

Il sangue deossigenato e carico di sostanze di scarto provenienti dai tessuti fluisce dai capillari alle venule, vasi con lume dal diametro medio di $20\ \mu\text{m}$ e spessore delle pareti di $1\ \mu\text{m}$ che permette ancora una minima percentuale di scambi. Dalle venule poi il sangue fluisce alle vene, il cui lume ha un diametro medio di $5\ \text{mm}$ e pareti sottili ($\sim 0.5\ \text{mm}$) che ne permettono facile dilatazione [5].

Per facilitare il ritorno del sangue al cuore molti di questi vasi, con eccezione delle vene cave, hanno valvole unidirezionali che ne impediscono il flusso retrogrado.

Le vene, oltre ad essere più superficiali delle arterie, sono più numerose e contengono più della metà del volume totale di sangue e rappresentano una riserva di volume.

1.3 CONSIDERAZIONI GENERALI SUI VASI SANGUIGNI INGEGNERIZZATI

Per essere adeguati sostituti delle loro corrispondenti naturali, i vasi sanguigni ingegnerizzati o TEVGs (*Tissue Engineered Vascular Grafts*) devono cercare di riprodurre il più fedelmente possibile le loro caratteristiche meccaniche e biochimiche/istologiche.

Idealmente, le protesi vascolari dovrebbero avere proprietà biomimetiche, ovvero essere capaci di instaurare interazioni positive con i tessuti al sito d'impianto tramite specifiche proteine.

Non essendo sempre possibile garantire tale condizione di idealità, la prima proprietà richiesta ai vasi ingegnerizzati, come a qualsiasi altro dispositivo protesico, è la biocompatibilità, ovvero la capacità di non evocare reazioni avverse nel sistema vivente. Nello specifico, il vaso artificiale non deve scatenare una risposta immunitaria negativa nel tessuto ospite e dovrebbe preferibilmente minimizzare l'infiammazione, riducendo al minimo il rischio di rigetto. È anche necessario prestare attenzione al rischio di infezione connesso all'introduzione di un materiale estraneo nell'organismo, poiché esso accresce la suscettibilità ai batteri e può risultare in infiammazioni croniche.

Inoltre, la superficie del lume non deve causare fenomeni trombotici, normalmente attivati in risposta alla presenza di un corpo estraneo. Pertanto, in particolar modo per quanto riguarda i vasi artificiali di piccole dimensioni, è necessario che il lume interno possieda uno strato di endotelio. In assenza di tale rivestimento o qualora esso non sia compatto e continuo, si potrebbe andare incontro alla formazione di trombi laddove vi sia mancanza di cellule endoteliali a causa dell'adesione delle proteine del sangue responsabili dell'attivazione dei meccanismi di coagulazione [4].

Il costrutto dev'essere adatto all'impianto e poter resistere alle procedure chirurgiche, cioè poter essere opportunamente manipolato e suturato. In particolare, è importante valutare la capacità di resistenza alla sutura (*suture retention strength*), che corrisponde alla forza necessaria per rimuovere una sutura dall'anastomosi (ovvero quando il filo chirurgico viene estratto dalla parete del vaso), così da assicurarsi che il vaso possa essere accuratamente saldato alla rete circolatoria. Tale parametro varia a seconda del tipo di vaso e della sua posizione, valori tipici appartengono all'intervallo di 80-250 grammi-forza [2].

Successivamente il vaso deve essere capace di integrarsi e favorire la proliferazione cellulare in vivo promuovendo la corretta angiogenesi al sito d'impianto, quindi crescere e rimodellarsi correttamente, oltre che auto-ripararsi per assicurare un'adeguata longevità, evitando la

formazione di tessuto fibroso cicatriziale, che potrebbe causare aderenze o come minimo alterare l'elasticità del vaso.

Dal punto di vista meccanico i vasi ingegnerizzati devono presentare un'adeguata resistenza al flusso fisiologico del sangue e quindi alle condizioni fisiologiche di pressione, senza andare incontro a rottura o deformarsi in modo permanente dando luogo ad aneurismi ed incrementando il rischio di emorragie. I valori massimi di pressione a cui devono poter resistere fanno riferimento a quelli dei vasi nativi: per le arterie si tratta di 2000–4225 mmHg, per le vene 1600–2300 mmHg [2].

Inoltre, siccome è auspicabile che l'impianto sia in grado di rispondere correttamente all'emodinamica anche a lungo termine, è necessario che il costruito abbia un'ottima resistenza alla fatica e un'elevata deformabilità in campo elastico. Tali parametri sono di importanza critica data la natura pulsatile del flusso sanguigno e devono essere verificati simulando le condizioni fisiologiche di periodicità dello stress e di temperatura.

Il calcolo della deformabilità deriva dalla variazione percentuale del diametro del lume in un intervallo di pressioni di 80–120 mmHg, pertanto è espressa in percentuale per 100 mmHg. I valori riportati per la vena safena sono di 0.7–2.6 % per 100 mmHg, mentre per l'arteria coronaria sono di 8.0–17.0 % per 100 mmHg [2].

Nel caso di una grossa discrepanza nelle suddette proprietà tra il vaso nativo e quello artificiale, vi è inoltre il rischio di sviluppare fenomeni di iperplasia, in special modo all'anastomosi dove si ha la concentrazione degli sforzi dovuti alla sutura.

Infine, per assicurarne l'effettiva commerciabilità, il vaso artificiale dovrebbe poter essere prodotto su larga scala con caratteristiche controllabili e riproducibili e si dovrebbe disporre della tecnologia necessaria a una corretta conservazione durante le fasi di trasporto, il tutto ad un costo accessibile.

Tutte le suddette proprietà sono necessariamente da tenere in considerazione nella scelta di tipologie cellulari, materiali per gli *scaffold* e tecniche di produzione.

1.4 TIPOLOGIE CELLULARI

1.4.1 CELLULE VASCOLARI AUTOLOGHE

Dalle caratteristiche anatomiche e fisiologiche dei vasi sanguigni discende la criticità della scelta delle cellule per lo sviluppo di un costruito ingegnerizzato funzionale. Infatti, a seconda della tipologia adottata, proprietà fondamentali come la capacità di ancorarsi, proliferare e integrarsi in vivo possono variare anche di molto.

Tra le diverse cellule, quelle endoteliali si rivelano di importanza primaria in virtù del fatto che i vasi sanguigni ingegnerizzati in cui è presente uno strato di tali cellule si dimostrano meno soggetti a iperplasia e a eventi trombotici, in quanto l'endotelio è l'unico materiale perfettamente anti-trombogenico. Fonte principale di queste cellule sono i pazienti stessi, da cui la denominazione di cellule vascolari autologhe. Il motivo di questa scelta è la possibilità di evitare una risposta immunitaria negativa o di sottoporre il paziente a terapie immunosoppressive volte a scongiurare il rigetto dell'impianto. Per contro la procedura per raccogliere tali cellule è invasiva e presenta possibili complicazioni e i processi di coltura sono costosi e dai tempi molto lunghi. Inoltre, a causa di fattori quali età e salute del donatore, è spesso difficile ottenere una quantità sufficiente di cellule endoteliali derivanti dal paziente stesso, che siano in grado di soddisfare gli standard di performance richiesti per il loro impiego [6].

1.4.2 CELLULE STAMINALI EMBRIONALI

Una possibile soluzione al problema potrebbe essere offerta dagli studi sulle cellule staminali, le quali possono avere origine embrionale o adulta.

Le prime derivano dall'embrione allo stadio di blastocisti e pertanto conservano l'abilità di differenziarsi nei tipi cellulari appartenenti a tutti e tre i foglietti embrionali (endoderma, mesoderma ed ectoderma) [4]. Cellule endoteliali derivate da cellule staminali embrionali si sono dimostrate capaci di integrarsi nell'apparato circolatorio di un topo e servire come condotto vascolare funzionante in uno studio durato 150 giorni [6]. Tuttavia, a causa del rischio teratogeno e dei dilemmi etici, non sono ancora stati condotti studi simili su pazienti umani.

1.4.3 CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI

Un'altra via potrebbe essere quella offerta dalle cellule staminali mesenchimali (MSCs - *Mesenchymal Stem Cells*). Tali cellule sono multipotenti e possono differenziarsi solamente nelle linee cellulari discendenti dal mesoderma. Nonostante questo limite e la rapidità con cui perdono la loro capacità di differenziarsi durante l'espansione in vitro a causa dell'invecchiamento, esse risolvono i problemi etici associati alle cellule staminali embrionali in quanto sono presenti anche nell'adulto in diversi tipi di tessuti e possono essere ottenute da diverse fonti, tra cui tendini, muscoli, cordone ombelicale, pelle, fegato, sangue, follicoli

piliferi e tessuto adiposo. La possibilità di acquisirne una quantità soddisfacente da una singola fonte risulta però ancora una sfida da superare per facilitarne l'applicazione clinica.

Vista la loro possibilità di differenziarsi in diverse cellule della linea mesodermica, le cellule vascolari di origine mesenchimale sono state utilizzate per riprodurre la tonaca media dei vasi sanguigni [4] e il loro impiego ha riportato molti vantaggi anche in termini immunosoppressivi. Si è osservato, infatti, che le MSCs rilasciano fattori anti-infiammatori come il TGF- β e l'HGF per inibire l'attivazione del sistema immunitario [6] e sembra pertanto possano ridurre la risposta immunogenica nel tessuto ospite.

A differenza delle cellule pluripotenti, la loro stabilità genomica e conseguente sicurezza per le applicazioni cliniche è stata documentata sia in vitro che in vivo. Pertanto, l'uso delle MSCs per la produzione di vasi sanguigni artificiali continua ad essere largamente investigato, tuttavia non è ancora stato sviluppato un costrutto ingegnerizzato, che abbia raggiunto applicazione clinica a seguito dei *trials* [6].

1.4.4 CELLULE PROGENITRICI

Un altro tipo di cellule staminali adulte sono le cellule progenitrici. Esse maturano in uno specifico tipo cellulare e possono essere ricavate dal midollo osseo o dal sangue, ma le loro riserve potrebbero essere praticamente esaurite nella popolazione più anziana. Anche il tessuto adiposo contiene cellule staminali (ASCs - *Adipose-derived Stem Cells*) che possono differenziarsi in cellule endoteliali o vascolari mesenchimali ed il loro impiego ovvia i problemi di disponibilità, visto che il loro numero sembra comunemente aumentare con l'età [6].

1.4.5 CELLULE STAMINALI PLURIPOTENTI INDOTTE

Studi più recenti hanno aperto la strada per l'impiego di cellule staminali pluripotenti indotte (iPSCs - *induced Pluripotent Stem Cells*), ottenute dalla conversione di cellule adulte provenienti dalla pelle del paziente (fibroblasti), le quali hanno il vantaggio di essere facilmente reperibili via biopsia. Tra gli innumerevoli vantaggi riportati dagli studi sull'utilizzo delle iPSC emergono quelli riguardanti la capacità di rigenerazione e la possibilità di essere riprogrammate per differenziarsi potenzialmente in qualsiasi tipo cellulare tramite l'espressione di appositi fattori [4].

Nello specifico, possono essere fatte differenziare in cellule endoteliali con maggiori capacità di proliferazione in vivo e abilità di produrre alcuni dei componenti essenziali della matrice

extra cellulare (ECM), tra cui collagene e elastina, rispetto a quanto evidenziato dalle cellule autologhe in vitro [7].

Riassumendo, in quanto riserva di facile accesso e potenzialmente illimitata di cellule con ridotto rischio di risposta immunitaria, le iPSCs rappresentano la risorsa più promettente per l'ingegneria tissutale, ma il loro effettivo impiego è ostacolato dal rischio di genesi tumorale associato alle cellule pluripotenti [8], che richiederebbe costi aggiuntivi per gli opportuni controlli e allungherebbe i tempi di produzione.

1.4.6 ACCENNI SU SEMINA E MATURAZIONE

Ottenute le cellule è necessario procedere con la loro semina sulle strutture di supporto (*scaffold*). Per fare ciò sono state sviluppate diverse procedure: semina passiva, semina dinamica e semina elettrostatica.

La semina passiva fu la prima ad essere introdotta e tuttora rimane la più utilizzata in virtù dei suoi bassi costi e della sua semplicità che consente di evitare che le cellule vengano danneggiate dagli sforzi meccanici derivanti dalla loro manipolazione [9]. Questa tecnica infatti consiste semplicemente nel depositare con una pipetta le cellule in sospensione direttamente sullo *scaffold*, facendovi seguire un periodo di incubazione per permettere l'adesione cellulare e la formazione del tessuto.

Tuttavia la distribuzione cellulare risulta disomogenea e questo, oltre a causare potenziali fenomeni trombotici, può comportare scarsa infiltrazione cellulare e quindi compromettere l'effettiva ricellularizzazione dello *scaffold*. L'efficienza di questo metodo infatti è piuttosto bassa rispetto alle altre tecniche [9] e sale al massimo fino al 42% includendo un'operazione per eliminare le bolle d'aria dalla matrice prima della semina [6].

Tuttavia è necessario tenere a mente che, affinché le cellule formino un tessuto funzionale, le sollecitazioni biomeccaniche a cui è sottoposto l'ambiente in cui sono site rivestono un ruolo fondamentale. Il metodo della semina passiva non sottopone le cellule agli sforzi meccanici dell'ambiente fisiologico, facendo mancare gli stimoli di meccano-trasduzione che garantiscono il corretto allineamento delle cellule endoteliali sullo *scaffold*.

Quest'osservazione ha portato alla ricerca e sviluppo di tecniche alternative come la semina dinamica. Tale metodo prevede l'applicazione di forze esterne che favoriscono una distribuzione più uniforme delle cellule e possono essere applicate con diverse tecniche tra cui quella della perfusione o l'uso di sistemi di forze centripete/centrifughe [9].

Pertanto sono stati sviluppati specifici bioreattori per riprodurre la fluidodinamica osservata in vivo che possono incrementare l'efficienza della semina fino al 90% [9] favorendo crescita, proliferazione e differenziazione cellulare. Tali bioreattori consistono di una camera di coltura nella quale viene posizionato il costrutto ingegnerizzato e di una pompa capace di sviluppare un flusso pulsatile che imiti quello del sangue in vivo con la possibilità di regolarne velocità, pulsazione, afflusso di nutrienti e ossigeno, temperatura e pH.

La possibilità di sottoporre il costrutto a tali stimoli meccanici è risultata in un incremento della formazione di ECM e della resistenza delle fibre di elastina che la compongono, oltre che in un generale miglioramento della deformabilità dei vasi ingegnerizzati [2]. Per contro sono stati riscontrati cambiamenti nella morfologia delle cellule e complicazioni come fallimento, fatica e contaminazione dovuti alla prolungata coltura delle cellule nei bioreattori [9].

Nonostante l'accuratezza con cui si cercano di riprodurre le condizioni fisiologiche e i vantaggi documentati nell'uso dei bioreattori per lo sviluppo di vasi artificiali con ottime proprietà già al termine della fase in vitro, è bene tenere a mente che tale step non può comunque sostituire i test in vivo.

Una terza tecnica di semina è stata sviluppata a partire dalle conoscenze sulla struttura della membrana plasmatica a doppio strato fosfolipidico, che presenta esternamente una superficie idrofilica carica negativamente. La semina elettrostatica prevede quindi di manipolare le proprietà elettrostatiche dello *scaffold* per promuovere l'adesione cellulare con un'efficienza anche del 90%. Si è osservato, inoltre, che questa tecnica accelera la maturazione cellulare e prolunga la ritenzione cellulare anche dopo l'impianto, riducendo il rischio di fallimento dell'innesto. Tuttavia le forze elettrostatiche consentono l'adesione delle cellule solo a livello superficiale, pertanto non risultano adatte alla produzione di strutture con tunica media; inoltre, mancano studi sul loro effetto a lungo termine. [6]

1.5 FATTORI BIOCHIMICI

Prima di procedere con la revisione dei materiali e delle tecniche di produzione utilizzati per gli *scaffold* dei vasi sanguigni ingegnerizzati è utile trattare un ultimo punto connesso ai processi di adesione, crescita e differenziazione delle cellule.

Dal punto di vista biochimico, infatti, si può intervenire a favore dell'integrazione dell'elemento protesico sfruttando determinate molecole segnale il cui ruolo fondamentale, oltre a quello di promuovere la differenziazione cellulare per la formazione dei tessuti durante

lo sviluppo embrionale, è quello di regolare la rigenerazione e il rimodellamento post-natale dei tessuti stessi, intervenendo anche nella guarigione delle ferite e come agenti anti-infiammatori.

Proprio per la loro capacità di indurre e accelerare la formazione di nuovo tessuto, i fattori biochimici rappresentano una delle aree di ricerca più promettenti nel campo dell'ingegneria tissutale, benché la loro applicazione pratica sia limitata dalla necessità di poterne disporre in quantità significative e dalla loro elevata instabilità.

In quanto proteine biologicamente attive, infatti, si tratta di macromolecole spesso insolubili, instabili e facilmente degradabili. Queste caratteristiche limitanti sono in parte ovviate tramite l'approccio della peptido-mimetica (*peptide mimicry*), che si basa sull'utilizzo di sequenze peptidiche selezionate, in grado di riprodurre le funzioni della sequenza segnale tipica della proteina nativa [4].

I vantaggi più significativi si rivelano nella possibilità di essere ottenute per sintesi chimica in quantità pressoché illimitata e nella possibilità di essere opportunamente modificate per aumentarne la stabilità conformazionale e la resistenza alla degradazione proteolitica. Qualora a seguito di questi processi mantengano almeno in parte l'attività biologica della proteina nativa, tali sequenze peptidiche offrono un'alternativa economicamente vantaggiosa all'utilizzo di proteine native [4].

Le sequenze segnale naturali che più si prestano a suddetto approccio appartengono ai fattori di adesione ed ai fattori di crescita.

I fattori che promuovono l'adesione cellulare hanno un ruolo fondamentale nel mantenimento della struttura dei tessuti e quindi per la loro funzionalità.

Il processo di adesione si realizza grazie ad interazioni altamente specifiche e selettive, che possono instaurarsi cellula-cellula o cellula-matrice extracellulare. Nel primo caso, tali interazioni possono avvenire tra le proteine di membrana delle singole cellule, permettendo l'instaurarsi di legami fra cellule adiacenti; nel secondo caso, con particolari proteine dell'ECM, consentendo alle cellule di legarsi a questa matrice che funge da supporto.

Tra le proteine di superficie delle cellule vi sono le classi delle integrine, caderine, immunoglobuline e selectine, chiamate appunto molecole di adesione cellulare (Cellular Adhesion Molecules, CAMs). Tra quelle dell'ECM si annoverano fibronectina, laminina, tenascina e vitronectina [4].

Una delle sequenze più comuni contenuta in molti di questi fattori di adesione e per questo ampiamente studiata sia in vitro che in vivo, è quella del tripeptide RGD (arginina-glicina-

acido aspartico) [4]. La sua versatilità l'ha resa protagonista di diverse applicazioni biomediche tra cui piastre di coltura in cui peptidi basati su tale sequenza imitano i segnali di adesione delle proteine dell'ECM e impianti medici rivestiti con sequenze RGD che sembrano esibire una miglior adesione delle cellule endoteliali, riducendo la probabilità di rigetto [10]. Anche i fattori di crescita sono proteine che si legano ad opportuni recettori presenti sulla membrana cellulare, ma il loro effetto è quello di innescare il processo di proliferazione, differenziamento o migrazione cellulare. Alcuni di questi fattori sono altamente specifici, altri invece hanno una buona versatilità, poiché capaci di promuovere la divisione cellulare in tipi cellulari diversi tra loro. Un utile esempio sono gli FGFs (*Fibroblast Growth Factors*), coinvolti sia nell'osteogenesi che nell'angiogenesi. Si tratta di proteine che legano l'eparina e intervengono in tessuti diversi giocando un ruolo fondamentale sia nei processi fisiologici che patologici, tra cui il rimodellamento osseo e la neovascolarizzazione. Il loro meccanismo d'azione prevede il coinvolgimento di quattro recettori di membrana, ma questa famiglia di fattori di crescita presenta anche una notevole affinità per l'eparansolfato. La possibilità di instaurare un legame con questo componente dell'ECM protegge gli FGFs dalla rapida degradazione che gli enzimi proteolitici operano sulle molecole libere [4].

CAPITOLO 2

APPROCCI E MATERIALI PER LO SVILUPPO DI VASI SANGUIGNI INGEGNERIZZATI

2.1 APPROCCIO SCAFFOLD-BASED

Come anticipato nel precedente capitolo, le cellule per sopravvivere e operare la loro funzione hanno la necessità di ancorarsi a una struttura di supporto che permetta loro di organizzarsi in tessuti: la matrice extra-cellulare (ECM). Tale struttura, di composizione variabile, dirige la migrazione e la proliferazione cellulare reclutando gli opportuni fattori di biochimici per rispondere adeguatamente ai segnali fisiologici [4].

Trattandosi di proprietà fondamentali per l'integrazione in vivo, appare chiara la necessità per i vasi sanguigni artificiali di disporre di un mezzo analogo che riproduca struttura e funzioni dell'ECM fornendo alle cellule una matrice sulla quale organizzarsi. Tale mezzo, che prende il nome di *scaffold*, deve rispondere ai requisiti sia meccanici che biologici visti nel capitolo precedente e disporre al contempo di una struttura sufficientemente porosa che offra alle cellule spazio per infiltrarsi e crescere durante il processo di formazione di nuovo tessuto.

Da questo presupposto nasce l'approccio *scaffold-based* o *top-down* al problema della produzione di vasi sanguigni artificiali, che prevede prima la produzione di uno *scaffold* e in uno stadio successivo la sua colonizzazione con le cellule. I principali vantaggi di tale approccio consistono nella possibilità di produrre strutture con buone proprietà meccaniche, mentre il principale svantaggio riguarda la scarsa, o comunque disomogenea, distribuzione cellulare, che può compromettere l'integrazione dell'impianto. [1]

Nei paragrafi successivi verranno indagate le diverse tipologie di *scaffold* adottate da tale approccio, approfondendo le caratteristiche dei principali biomateriali che li compongono, siano essi di origine naturale o sintetica, ponendo particolare attenzione sulle caratteristiche che li rendono più o meno adatti allo scopo di produrre vasi sanguigni artificiali.

2.1.1 SCAFFOLD DECELLULARIZZATI

Il primo esempio di approccio *scaffold-based* ad essere stato riportato in letteratura è quello operato da Weinberg e Bell nel 1986 [11]. La via perseguita dai ricercatori per la produzione dello *scaffold* fu la decellularizzazione, la quale prevede la rimozione delle cellule dal tessuto naturale tramite agenti chimici, enzimi o per via meccanica (*physical agitation*) [1].

Tale metodo, fondamentale nei trapianti eterologhi ancor più se allogenici, permette di ridurre l'antigenicità dello *scaffold* in quanto rimuove le componenti del tessuto capaci di evocare reazioni immunitarie nel paziente ricevente, minimizzando il rischio di infiammazione e rigetto e mantenendo al contempo le componenti dell'ECM che va ripopolata in vitro con le cellule prescelte, così da favorire l'integrazione in vivo dell'impianto.

Il trattamento generalmente operato su tessuti di origine animale, frequentemente bovina o suina, consiste di due passaggi: il primo volto a causare la lisi cellulare, ad esempio sottoponendo il tessuto a un ambiente fortemente ipotonico che porta le cellule ad assorbire acqua fino a esplodere; il secondo prevede l'uso di detergenti per rimuovere i detriti cellulari.

L'efficacia della tecnica dipende da diversi fattori ed è stata studiata da Crapo et al. [12] in una revisione dei processi di decellularizzazione, nella quale sono stati individuati tre requisiti minimi per il tessuto decellularizzato, i quali prevedono che esso debba contenere meno di 50 ng di DNA per mg di ECM; che la lunghezza dei frammenti di DNA debba essere inferiore ai 200 bp; che dalle tecniche di colorazione del DNA non risulti visivamente presente materiale nucleare.

Sebbene la decellularizzazione sia un approccio relativamente semplice, non è l'alternativa economicamente più vantaggiosa e i trattamenti chimici che la caratterizzano possono causare una perdita delle proprietà meccaniche della struttura. Inoltre alcuni dei reagenti utilizzati, come la glutaraldeide, spesso usata sia per aumentare la resistenza del tessuto alla degradazione chimico-enzimatica sia per ridurre l'immunogenicità, possono lasciare residui tossici responsabili di reazioni infiammatorie capaci di indurre il fallimento dell'impianto [4].

Nonostante queste problematiche, esistono diversi studi [2] che dimostrano l'applicabilità della tecnica evidenziandone l'efficace integrazione e la capacità di sostenere gli sforzi derivanti dal flusso sanguigno in vivo, ma è necessaria ulteriore ricerca per garantire l'affidabilità clinica di questi impianti.

2.1.2 SCAFFOLD NATURALI

Come alternativa alla decellularizzazione si è pensato alla produzione artificiale di *scaffold*, cosicché non fosse più necessario rimuovere le cellule, ma solamente aggiungerle. Risulta pertanto evidente che la scelta del materiale per lo *scaffold* debba tenere conto della sua predisposizione a favorire l'adesione cellulare. In tal senso la scelta di polimeri naturali appare chiaramente favorita, in quanto essi posseggono tale caratteristica.

L'ulteriore vantaggio connesso all'uso di polimeri naturali risiede nella loro elevata biocompatibilità in quanto si tratta di polimeri già naturalmente presenti nell'organismo e nella stessa composizione dell'ECM, come collagene, elastina e fibrina.

Di questi, il collagene è il più abbondante ed il principale responsabile del supporto meccanico alle cellule, in virtù della sua organizzazione strutturale (Fig. 2). Tale proteina è composta da catene polipeptidiche α intrecciate in una tripla elica compatta. Le singole catene α sono una sequenza di oltre 1400 amminoacidi, tra cui si ha la frequente ripetizione della tripletta Gly-Pro-Hyp. Esse assumono struttura terziaria elicoidale sinistrorsa, mentre complessivamente si intrecciano in una superelica destrorsa, che costituisce la struttura quaternaria del tropocollagene. Questo precursore del collagene costituisce delle fibrille associandosi in file parallele sfalsate ed instaurando legami covalenti crociati testa-coda (*cross-links*) molto forti. [4]

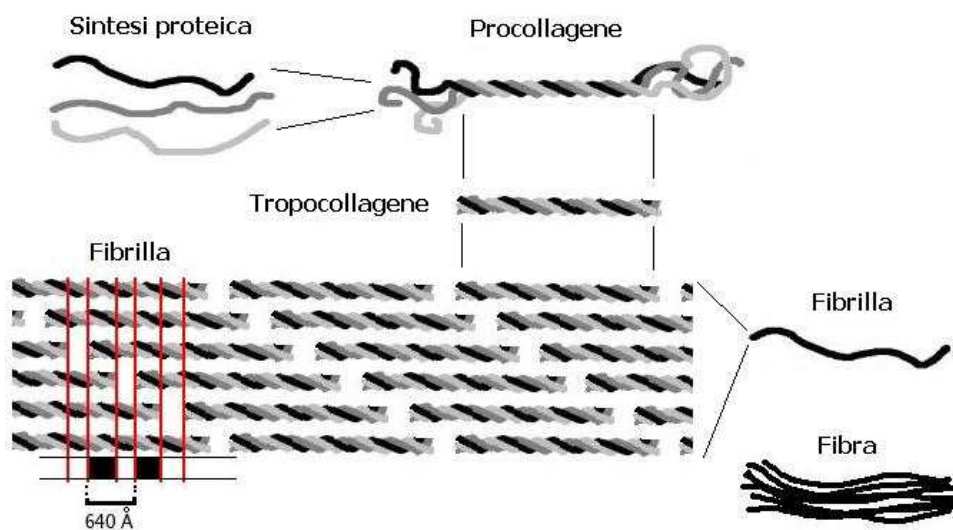


Fig. 2 Organizzazione strutturale del collagene [13]

Tale organizzazione è responsabile dell'elevata resistenza a trazione del collagene, che lo rende adatto a diverse applicazioni nell'ambito dell'ingegneria tissutale.

Ulteriori vantaggi nell'uso di tale polimero risiedono nella bassa antigenicità, che riduce il rischio di una risposta immunitaria avversa, e nella presenza di sequenze di legame per le integrine capaci di favorire l'adesione cellulare. Inoltre, il collagene è di facile reperibilità, in quanto può essere ricavato da fonti animali in virtù della sua larga presenza in tendini e pelle. Pertanto risulta piuttosto economico, tuttavia la qualità varia da lotto a lotto e oltre ai possibili dilemmi etici connessi all'uso di animali vi è il rischio di trasferire agenti patogeni al paziente [4].

Inoltre è necessario specificare che sebbene gli *scaffold* a base di collagene si siano dimostrati un'ottima soluzione nella sostituzione di tratti venosi del sistema circolatorio, non si può dire altrettanto per i tratti arteriosi dove la pressione è maggiore [6].

Altro componente dell'ECM è l'acido ialuronico, un polisaccaride ad alto peso molecolare con ottime proprietà di biocompatibilità e biorisorbibilità, che non evoca reazioni immunogeniche né trombogeniche ed è in grado di prevenire le adesioni. Ha ruolo chiave nel supporto e nella riparazione tissutale, ma interviene anche nell'adesione, crescita e migrazione cellulare. Vista la sua ubiquitarità è anche di facile reperibilità, ma risulta penalizzato dalla sua solubilità in acqua che lo espone a una veloce cinetica di degradazione in vivo e dalle ridotte proprietà viscoelastiche dovute ai suoi legami non covalenti. Nella pratica è usato come polimero semisintetico (HYAFF®, Anika Therapeutics), dopo esterificazione dei suoi gruppi carbossilici con alcol benzilico. In questa forma resta sempre biocompatibile, ma è più lento alla degradazione e facilmente processabile [4].

Altro polisaccaride con ottima biocompatibilità, economico e facilmente reperibile è l'agarosio. Tuttavia per le sue scarse proprietà di adesione cellulare dev'essere utilizzato in combinazione con altri polimeri, come il fibrinogeno, con il ruolo di fattori di adesione. [1]

Tornando ai componenti dell'ECM, anche la fibrina presenta proprietà interessanti per la produzione di *scaffold* per vasi sanguigni. Tale proteina gioca un ruolo fondamentale nei processi di coagulazione del sangue e nella guarigione delle ferite e pertanto può essere ricavata direttamente dal sangue del paziente garantendo perfetta biocompatibilità. Per contro, presenta delle limitazioni legate alla scarsa stabilità meccanica e durabilità, oltre che costi elevati. [1]

Riassumendo, risulta evidente che in generale i polimeri naturali sono caratterizzati da ottime proprietà biochimiche, ma proprietà meccaniche non ottimali, che nel caso dei condotti vascolari possono risultare nel collasso dell'impianto sotto lo sforzo della pressione sanguigna o quantomeno in deformazioni permanenti che possono ostruire il lume.

Da queste osservazioni è emersa la necessità di sperimentare alternative sintetiche per la costruzione degli *scaffold*.

2.1.3 SCAFFOLD SINTETICI

In risposta alla necessità di disporre di migliori proprietà meccaniche rispetto a quelle offerte dai polimeri naturali, la ricerca dei materiali per gli *scaffold* si è orientata a polimeri sintetici,

Due primi esempi sono l'acido poliglicolico (PGA) e l'acidopolilattico (PLA). Tali polimeri hanno il vantaggio di essere biodegradabili ed è significativo il fatto che la loro cinetica di degradazione possa essere modellata sulla base delle necessità cliniche, assicurandone la presenza nell'organismo per il tempo necessario ad adempiere alla loro funzione per poi venire degradati e riassorbiti, lasciando spazio al tessuto di nuova formazione una volta che le cellule si siano integrate con i vasi nativi in vivo [4].

Per loro natura sono liberi da dilemmi etici e prontamente disponibili, rimanendo comunque una soluzione a basso costo. Infatti, possono essere ottenuti in modo facilmente riproducibile da reazioni di condensazione di monomeri naturalmente presenti nell'organismo, rispettivamente l'acido glicolico e l'acido lattico. In presenza di acqua, abbondante in ambiente fisiologico, la reazione di polimerizzazione regredisce e i monomeri possono essere facilmente metabolizzati, da cui la biorisorbibilità di tali polimeri [4].

Essi rivelano, inoltre, buone proprietà meccaniche. *Scaffold* a base di PGA, ad esempio, si sono dimostrati capaci di sopportare un carico a rottura superiore a quello della vena safena [6]. Tuttavia spesso si preferisce usare *scaffold* copolimerici in cui il PLA, in virtù della sua maggiore idrofobicità data dalla presenza del gruppo -CH₃ nei suoi monomeri (Fig. 3), è introdotto per compensare la veloce cinetica di degradazione del solo PGA.

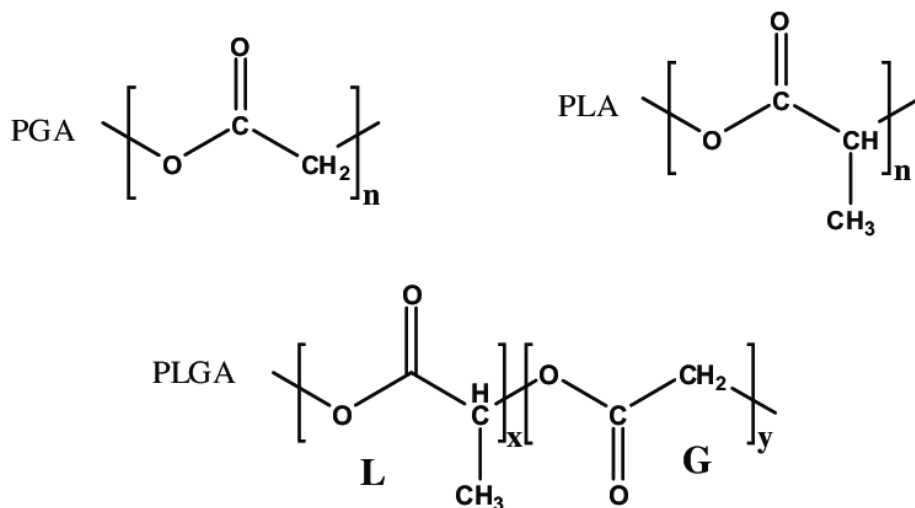


Fig. 3 Struttura chimica dei polimeri PGA, PLA e PLGA [14]

La rigidità di tali *scaffold*, tuttavia, ne rende difficoltosa la sutura ed espone il paziente a rischi legati alle diverse proprietà meccaniche del materiale sintetico rispetto al tessuto biologico, almeno fino a ricolonizzazione non avvenuta.

Altri polimeri noti per la loro biocompatibilità e generalmente usati nella forma di hydrogel, ovvero di miscela colloidale in cui le catene polimeriche sono disperse in acqua, sono PVA, PCL, PEG.

Infine il Pluronic® F127 è un copolimero a blocchi costituito da un blocco centrale idrofobico di polipropilene glicole affiancato da due blocchi idrofili di polietilene glicole. Ha viscosità stabile in un range di temperature molto ampio, da 0 a 40 °C, che gli permette di rimanere in forma di gel da temperatura ambiente a temperature fisiologiche, rendendolo una scelta ottimale come bioinchiostro nei processi di stampa 3D degli *scaffold* di cui tratterà il seguente capitolo. Ciò che lo rende interessante è anche la sua caratteristica di rispondere agli stimoli termici, che gli rendono possibile riprodurre autonomamente i meccanismi di vasodilatazione e vasocostrizione. Tuttavia il suo principale svantaggio è la solubilità in ambiente acquoso che lo rendono singolarmente inutilizzabile per la produzione di *scaffold* che debbano garantire durabilità nel tempo [1].

Da quanto visto risulta che i polimeri sintetici, in generale, presentano il vantaggio di essere facilmente lavorabili e più economici da produrre, presentando anche una migliore riproducibilità e una più ampia diversità strutturale. Tuttavia non presentano caratteristiche soddisfacenti in merito all'adesione cellulare. Pertanto, il loro utilizzo per la produzione di *scaffold* comporta necessariamente l'impiego di fattori di adesione.

Per ridurre tali svantaggi si è anche pensato a una soluzione intermedia rappresentata dagli *scaffold* ibridi, o semi-sintetici, ottenuti a partire da polimeri sintetici con l'aggiunta di polimeri naturali nel tentativo di trarre il meglio da entrambe le categorie. Un esempio significativo tratto da questo gruppo è il GelMA (gelatin methacryloyl), un hydrogel con gruppi di metacrilammide e metacrilato, con importanti somiglianze strutturali con l'ECM che, assieme alla presenza di peptidi favorevoli all'adesione cellulare, lo rendono di particolare interesse per la produzione di TEVGs. Inoltre è biodegradabile, non-citotossico ed è frequentemente utilizzato nelle biostampanti laser per la sua capacità di formare legami crociati se sottoposto ai raggi UV [1].

Sebbene tali *scaffold* ibridi presentino proprietà promettenti, è comunque necessario tenere a mente che anch'essi possono conservare delle limitazioni derivanti dai materiali di origine.

2.2 APPROCCIO SCAFFOLD-FREE

Prima di passare al capitolo dedicato alle tecniche di produzione degli *scaffold* è rilevante citare un ulteriore approccio alla costruzione di vasi sanguigni artificiali.

Per evitare l'insieme di problematiche connesse all'uso di uno *scaffold* si è infatti pensato a una soluzione che non ne preveda uno, da cui la denominazione *scaffold-free* o *bottom-up*. [1]

In tal caso si parte da unità multicellulari precostituite che opportunamente assemblate possono produrre le componenti dell'ECM integrandosi autonomamente e rendendo superflua la presenza di uno *scaffold*.

Le unità di partenza possono essere fogli di cellule vascolari autologhe successivamente arrotolati a formare strutture tubulari poi immerse in bioreattori allo scopo di permettere la fusione fra i vari strati e alle cellule di produrre la propria ECM [6].

I principali svantaggi di questa tecnica sono i costi elevati e i lunghi tempi di produzione che possono estendersi dai sei ai nove mesi [6], salvo fare uso di cellule staminali o cellule progenitrici che permettono di ridurre le tempistiche a 35-48 giorni [15]. Inoltre, poiché sprovvisti di una struttura di sostegno robusta, gli innesti vascolari prodotti con tale approccio risultano generalmente dotati di proprietà meccaniche inferiori. Tuttavia, presentano il vantaggio di presentare un'elevata densità cellulare che favorisce la loro integrazione in vivo.

CAPITOLO 3

TECNICHE DI PRODUZIONE

3.1 ADDITIVE MANUFACTURING - STAMPA 3D

Come evidenziato dal capitolo precedente, vi è una scelta tutto sommato ampia di materiali con le proprietà richieste a dei vasi sanguigni artificiali. Tuttavia oltre ai requisiti biologici e meccanici che essi devono presentare in quanto sostituti vascolari, bisogna tenere conto anche della loro effettiva lavorabilità con le moderne tecnologie di produzione dell'ingegneria tissutale. Come appare evidente dal rovescio di prospettiva offerto dall'approccio *scaffold-free*, le tecniche per ottenere vasi sanguigni artificiali possono seguire strade anche molto diverse, tutte accomunate dall'obiettivo di riprodurli il più fedelmente possibile, ma quelle che verranno illustrate nel seguente capitolo si rivolgono prevalentemente all'approccio *scaffold based*. Tali tecniche offrono infatti ottime potenzialità in ambito clinico poiché offrono un alto grado di controllo sulla morfologia dello *scaffold*, fondamentale per ottenere le proprietà meccaniche desiderate oltre che le giuste caratteristiche di porosità.

Nonostante la pluralità di tecnologie sviluppate quella che oggi garantisce maggior fedeltà e risoluzione, oltre che una diminuzione dei costi e delle tempistiche rispetto alle tecniche più tradizionali, è l'AM (*Additive Manufacturing*), o stampa 3D.

Tale tecnica è emersa alla fine degli anni '80, ma è solo dagli anni 2000 che si è propriamente avvicinata al campo dell'ingegneria tissutale grazie allo sviluppo delle prime biostampanti. Da allora si è largamente diffusa in particolare modo nel campo della produzione di vasi sanguigni artificiali, dove la necessità di ottenere condotti cilindrici con lume adeguato, porosità controllata e diversi strati concentrici non semplicemente sovrapposti, renderebbe particolarmente ardua e costosa la produzione secondo qualunque altra via.

Lo sviluppo di tale tecnica, incentivato anche dalla possibilità di ottenere prodotti personalizzabili a seconda delle necessità, in modo veloce, facilmente riproducibile ed economico, ha comunque portato vantaggi anche alle metodologie che non fanno uso di *scaffold*, favorendo la nascita di approcci ibridi. Nei paragrafi successivi verranno esplorate le diverse applicazioni della stampa 3D a seconda dell'approccio adottato da diversi gruppi di ricerca e, a seguire, verranno presentate le diverse tecnologie AM e gli ulteriori sviluppi offerti dall'elettrofilatura (*electrospinning*) nelle sue due declinazioni principali (*solution electrospinning* e *melt electrowriting*).

3.1.1 ADDITIVE MANUFACTURING PER L'APPROCCIO SCAFFOLD-BASED

Un primo vantaggio esplorato da Kuribayashi-Shigetomi et al. [16] nel 2012 fu la possibilità di sfruttare la fotolitografia per produrre strutture a cerniera (Fig. 4A-C) in grado, opportunamente ripiegate, di assumere diverse geometrie tridimensionali mantenute grazie alle forze di trazione esercitate dalle cellule, incluse forme cilindriche adatte a imitare i condotti vascolari.

Nel 2018 Xu et al. [17] sfruttarono l'AM per stampare una struttura di supporto per l'ECM decellularizzata, ovviando così al problema delle scarse proprietà meccaniche dei tessuti sottoposti al trattamento di decellularizzazione. Ripopolando poi la struttura con le opportune cellule al fine di riprodurre le tre tonache, i ricercatori riuscirono a ottenere un vaso artificiale (Fig. 4D) con l'alta biocompatibilità di un tessuto naturale e una resistenza meccanica ottimizzata dalla struttura di supporto ottenuta dalla stampa 3D.

I vantaggi offerti dall'AM non si limitano però a poter stampare strutture di ottima resistenza meccanica, riguardano anche la possibilità di creare strutture geometricamente complesse e con un alto livello di risoluzione in materiali delicati come il collagene.

È questa la possibilità esplorata da Lee et al. [18] nel 2014. In questo caso i ricercatori stamparono un letto di collagene, sotto al quale posero due condotti in gelatina e una mistura di fibrina e cellule tra di essi. Ricoperto il tutto con collagene e liquefatta la gelatina, gli spazi lasciati da essa vennero seminati di ECs, in grado poi di attivare il processo di angiogenesi e di costituire una rete di capillari (Fig. 4E) a partire da quei canali ed estendendosi all'interno dello *scaffold* costituito dalla fibrina.

3.1.2 ADDITIVE MANUFACTURING PER L'APPROCCIO SCAFFOLD-FREE

Per quanto riguarda l'approccio che non fa uso di *scaffold* per la produzione di vasi sanguigni, è importante sottolineare che il suo utilizzo senza i vantaggi offerti dall'AM risulta ancor più difficoltoso rispetto all'approccio con *scaffold*, in quanto fa uso di strutture delicatissime altrimenti difficilmente maneggiabili, come nel caso delle sfere a hydrogel endotelializzate stampate da Schoneberg et al. [19] nel 2018.

Un'altra applicazione esemplare della tecnologia AM per l'approccio *scaffold-free* è fornita da Norotte et al. [20], i quali nel 2019 grazie all'uso di una biostampante depositarono strato per strato degli sferoidi e dei cilindri di cellule del diametro di 300-500 μm (Fig. 5). A seguito di un processo di fusione post stampa furono in grado, a partire dalle singole unità, di costituire strutture ramificate di condotti vascolari bi-strato di diametro notevolmente piccolo,

assicurandosi al contempo la massima densità cellulare possibile, sebbene le proprietà meccaniche richiedano ulteriori studi per essere ottimizzate.

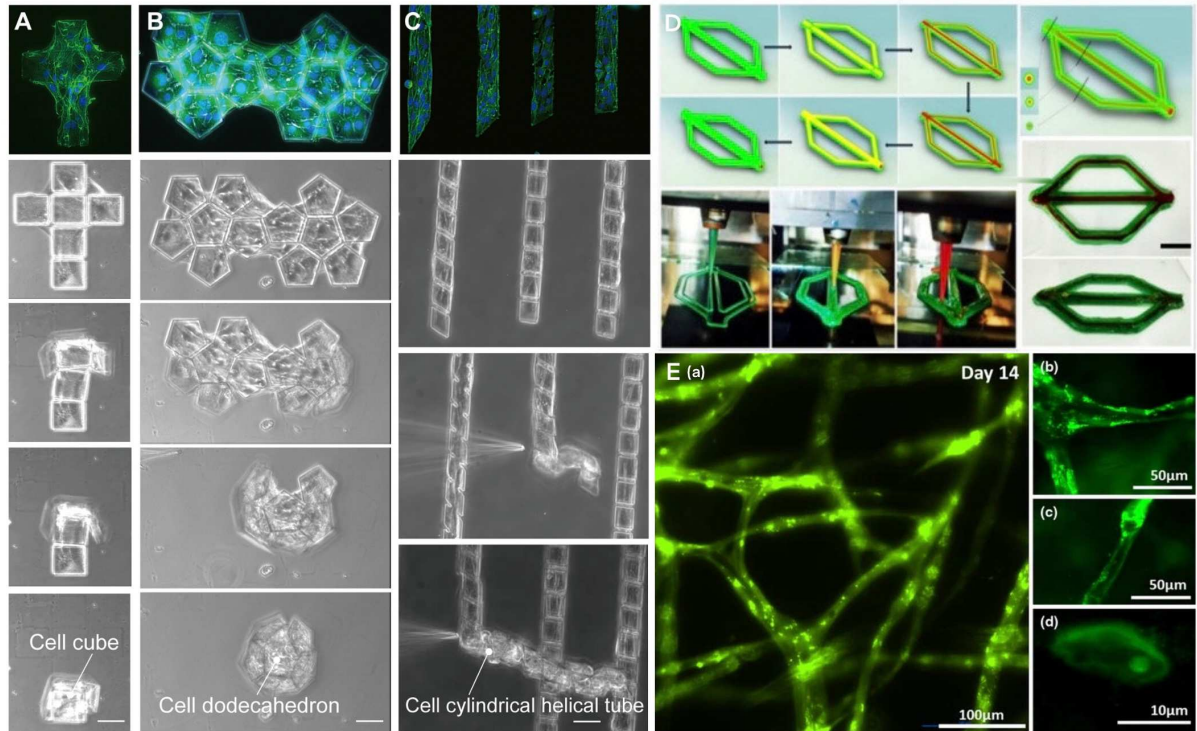


Fig. 4 (A) Microstrutture ripiegate a tetragono regolare, (B) dodecagono regolare e (C) a tubo cilindrico, Kuribayashi-Shigetomi et al. [16]. (D) Modello vascolare a 3 strati (scala 1 cm), Xu et al. [17]. (E) HUVECs integrate in gel di fibrina dopo 14 giorni di coltura, Lee et al. [18]: (a) microscopia a fluorescenza ad ampio campo della rete di capillari; (b-d) ingrandimento che evidenzia la presenza del lume.

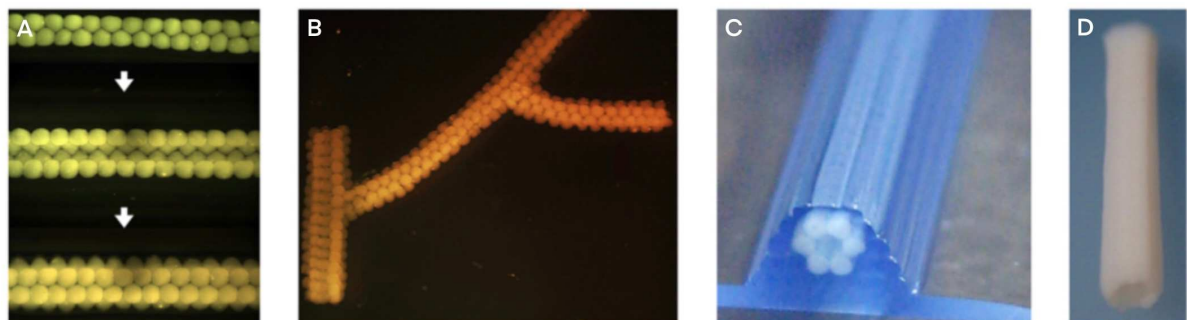


Fig. 5 Prodotti AM *scaffold-free*, Norotte et al. [20]. (A) Processo di fusione degli sferoidi multicellulari per la fabbricazione di strutture tubulari. (B) Struttura tubulare ramificata ottenuta da sferoidi di 300 μm . (C) Cilindri multicellulari (in bianco) supportati da cilindri in agarosio (colorati in blu) (D) Vaso multicellulare (diametro interno di 1.5 mm).

3.1.3 TECNOLOGIE DI ADDITIVE MANUFACTURING

Per apprezzare la versatilità della tecnica ed evidenziare i diversi vantaggi forniti dalle varie tecnologie sviluppate, esplorando per ognuna le potenzialità e le limitazioni nel campo della produzione di vasi sanguigni artificiali, queste verranno esaminate consequenzialmente nei seguenti paragrafi.

Attualmente le tecnologie usate più di frequente sono quelle in cui il materiale per lo *scaffold*, caricato come inchiostro tramite delle cartucce in apposite siringhe o pistole pneumatiche, viene poi depositato per estrusione su un substrato posto direttamente sotto di esse secondo un percorso in genere definito via software (Fig. 6).

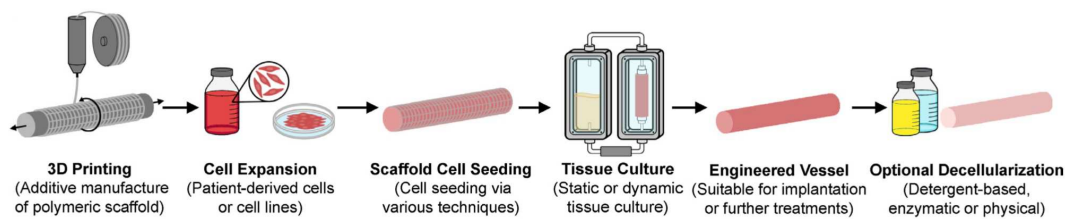


Fig. 6 Schematizzazione del processo di 3D Printing [2]

La larga diffusione di questo metodo è dovuta a diversi fattori tra cui la possibilità di ovviare al successivo step di semina cellulare (Fig. 7) facendo uso di speciali *bioinks*, inchiostri formulati in modo da contenere già le cellule desiderate. Un esempio è dato da Cui e Boland [21] che nel 2009 riuscirono a includere cellule EC umane direttamente in un inchiostro biologico a base di fibrina, così da poter stampare in maniera diretta strutture microvascolari.

Inoltre non sono da tralasciare fattori quali l'accessibilità del metodo e la possibilità di personalizzare la composizione del *bioink* da utilizzare. In questo modo si ha anche la possibilità di ottenere manufatti eterogenei, depositando strati di diversi tipi cellulari.

Tuttavia, in merito a quest'ultima caratteristica, è necessario specificare la criticità del controllo della viscosità dell'inchiostro prescelto, in quanto con il suo aumentare cresce anche la pressione necessaria al processo di estrusione e conseguentemente gli *shear stress* a cui sono sottoposte le cellule e dai quali potrebbero risultare permanentemente danneggiate. Viceversa se la viscosità risultasse troppo bassa il prodotto di stampa non sarebbe in grado di auto-sostenersi e la struttura non manterrebbe la forma e le proprietà meccaniche desiderate. Tale parametro va regolato anche in relazione alla dimensione dell'ago dal quale avviene

l'estensione e quindi dalle dimensioni richieste dalla geometria del costrutto ingegnerizzato [1].

In merito a quest'ultima, un possibile problema connesso alle dimensioni molto ristrette, unite all'uso di materiali molli per gli inchiostri, riguarda la frequente alterazione delle geometrie prestabilite. Nello specifico, poiché l'estrusione dei prodotti tubulari avviene in configurazione orizzontale, il peso della struttura stessa potrebbe causare delle irregolarità nella forma del condotto e in particolare nella dimensione del suo diametro se questo supera una certa soglia.

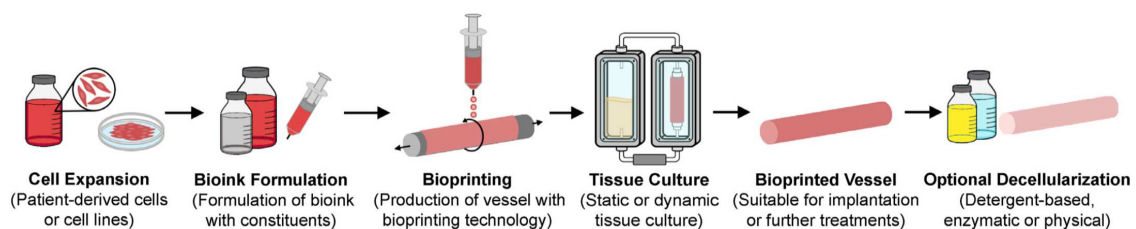


Fig. 7 Schematizzazione del processo di Bioprinting [2]

Inoltre, per favorire la sopravvivenza delle cellule, potrebbe essere necessario un periodo di recupero dallo stress causato dal processo di estrusione, così che le cellule possano guarire dagli eventuali danni subiti garantendo l'integrità della membrana plasmatica [1].

Nonostante la necessità di prestare attenzione a questi fattori, l'AM per estrusione resta la più comunemente utilizzata in virtù della sua semplicità, dei bassi costi, dell'elevata possibilità di customizzazione e della possibilità di lavorare simultaneamente con diversi materiali, semplificando i processi di produzione dei condotti vascolari che richiedono strati di diversa composizione.

Una variazione del processo per estrusione è il metodo FRESH (*Freeform Reversible Embedding of Suspended Hydrogels*), pensato appositamente per *bioinks* particolarmente molli, ad esempio con cellule incapsulate in collagene. Tale metodo fa uso di un supporto temporaneo e termoreversibile a base di hydrogel, che possa garantire la fedeltà della geometria in fase di stampa, dando sostegno strutturale ai materiali molli, e successivamente possa essere lavato via. In questo modo si ha quindi un elevato controllo della macro e micro struttura, ovviando il rischio di deformazioni indesiderate o del collasso del lume, garantendo un'ottima riproducibilità del prodotto e mantenendo comunque un costo contenuto [1].

Altro metodo basato sull'estrusione in questo caso di un filamento polimerico fuso è l'FFF o FDM (*Fused Filament Fabrication* o *Fused Deposition Modelling*), che nel caso dei TEVGs è usato principalmente per la produzione di template sacrificali a causa della scarsa risoluzione e delle limitazioni riguardanti i materiali utilizzabili. Il filamento viene depositato per creare un reticolo 3D poi rivestito con un polimero biocompatibile sul quale viene deposto hydrogel contenente cellule. Successivamente il template viene dissolto per lasciare spazio per l'iniezione di cellule EC nella rete che si è così andata a creare [1].

Un'altra opzione è data dalla tecnologia a getto d'inchiostro (*Inkjet technology* o *electromagnetic droplet*), che si basa su un sistema (acustico, termico o elettrostatico) per eiettare gocce di materiale ad alta velocità, garantendo un'ottima percentuale di sopravvivenza cellulare (> 80%), alta risoluzione e bassi costi. È importante tenere presente che, nel caso di sistemi ad attivazione termica, la temperatura potrebbe danneggiare le cellule compromettendone la sopravvivenza, pertanto è necessario che queste siano disperse in un materiale con bassa conducibilità termica. Altro grande limite di questa tecnologia riguarda l'impossibilità di ottenere strutture a strati di diversa composizione, in quanto ogni sistema di stampa è progettato per lavorare con un unico tipo di *bioink*, la cui viscosità derivante dalla densità cellulare va monitorata per evitare che l'ago si intasi e le cellule si danneggino [1].

Per ovviare gli effetti negativi degli *shear stress* a cui sono sottoposte le cellule col passaggio nell'ago d'estrusione, si può guardare indietro alla stereolitografia (SLA), il primo metodo di stampa 3D ad essere stato sviluppato. Tale tecnologia non fa uso di alcun ago e garantisce comunque una fabbricazione rapida ed accurata, con una risoluzione fra i 5 e 300 μm . Tuttavia, facendo uso di polimeri fotosensibili da stimolare a luce UV o luce visibile, la SLA richiede la presenza di fotoiniziatori con potenziali effetti tossici sulle cellule [1]. Inoltre l'esposizione prolungata ai raggi UV può notoriamente danneggiarne il DNA, pertanto si sono cercati fotoiniziatori con una cinetica di polimerizzazione più veloce così da poterla ridurre [1].

Una variazione di tale tecnologia, pensata proprio per ridurre l'esposizione ai raggi UV, è il *Digital Light Processing* (DLP). In questa tecnica i diversi strati vengono fatti polimerizzare da una singola emissione di luce.

Un ulteriore passo in avanti nel minimizzare i danni procurati dagli UV è avvenuto con la tecnologia 2PP, in grado di far polimerizzare i materiali fotosensibili nel raggio di messa a fuoco del laser a impulsi ultracorti attraverso l'assorbimento di due soli fotoni. Grazie a questo processo si può ottenere una risoluzione al di sotto del micron ed è possibile stampare

in dimensioni inferiori ai 200 nm, anche se i tempi per completare il processo sono molto lunghi e il massimo volume stampabile è limitato a pochi millimetri [1].

In generale, quindi, le bio-stampanti che inviano raggi laser a pulsazione controllata su dei substrati riceventi sono in grado di garantire intervalli più ampi di viscosità (da 1 a 300 mPa/s) e densità cellulari maggiori, mantenendo elevata accuratezza (attorno ai 2 μm) e con la sola necessità di tenere monitorata la temperatura, siccome il calore generato dal processo potrebbe danneggiare le cellule facendo precipitare l'altrimenti elevatissima percentuale di sopravvivenza (attorno al 90-95% [1]).

3.2 ELECTROSPINNING

Ad implementare sostanzialmente le tecnologie AM per la produzione di *scaffold* per vasi sanguigni a fibre in scala microscopica e nanoscopica vi è l'elettrofilatura (*electrospinning*) o filatura elettrostatica (Fig. 8).

Tale tecnologia consente di produrre fibre continue a partire da materiali polimerici portati ad uno stato di fluido viscoso per dissoluzione in opportuni solventi o per fusione, sfruttando poi le proprietà elettro-idrodinamiche del getto polimerico estruso, il quale viene controllato tramite l'applicazione di un potenziale elettrico [2].

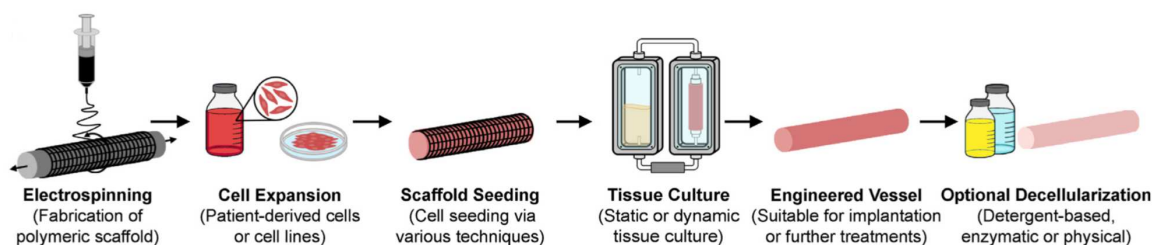


Fig. 8 Rappresentazione schematica della tecnica dell'elettrospinning [2]

Di seguito verranno espone le due principali direzioni operative in cui tale tecnica si è sviluppata a seconda del metodo usato per portare il materiale polimerico alla condizione fluida.

3.2.1 SOLUTION ELECTROSPINNING

Nel caso dell'elettrofilatura per soluzione, i polimeri sono dissolti in un solvente per formare una soluzione omogenea da poter estrudere dall'ago di stampa con opportuna pressione e in condizioni di differenza di potenziale. Si osserva in questo modo la formazione di un getto a

cono di Taylor che viene quindi accelerato, allungato e assottigliato dal campo elettrostatico indotto. Nel tragitto verso il substrato il solvente intanto evapora permettendo la solidificazione delle micro- e nanofibre così ottenute e depositate secondo necessità [2].

Nonostante il largo impiego di questa tecnica, vi sono tuttavia degli aspetti tecnici che ne limitano l'applicabilità. In primis, la scelta del solvente deve tener conto della sua possibile citotossicità, inoltre l'evaporazione dello stesso rende il getto instabile riducendo la precisione con cui le fibre possono venir depositate e il controllo su altri parametri di fondamentale importanza per il successo dello *scaffold*, come omogeneità del diametro e corretta porosità, che se alterati possono compromettere l'infiltrazione e la proliferazione cellulare [2].

Sebbene tale tecnica faccia uso prevalente di polimeri sintetici, è stato dimostrato che integrare la soluzione con componenti naturali può migliorare drasticamente le proprietà meccaniche dello *scaffold* prodotto. Nello specifico, Lee et al. [22] sperimentando l'utilizzo nell'elettrofilatura di diversi polimeri sintetici in soluzione con collagene di tipo I al 45% e elastina al 15% riuscirono a ottenere *scaffold* tubulari con eccellente modulo elastico (2.08 MPa per lo *scaffold* a base di PLLA) e elevata stabilità dimensionale nel periodo di coltura, con riduzioni minime nel diametro (attorno al 10% per *scaffold* a base di PLLA e PCL) [2].

Un ulteriore passo avanti nell'integrazione di componenti naturali in tale tecnica si è potuto compiere grazie all'indagine di Shalumon et al. [23] riguardo l'uso della gelatina per ottimizzare l'adesione e la proliferazione cellulare, oltre che per migliorare la qualità della filatura. In effetti nelle seguenti immagini si può osservare come le SMCs mostrino un incremento d'adesione proporzionale alla concentrazione di gelatina (Fig. 9B) e come questa aiuti al contempo ad ottenere nanofibre ben allineate (Fig. 9A) [2].

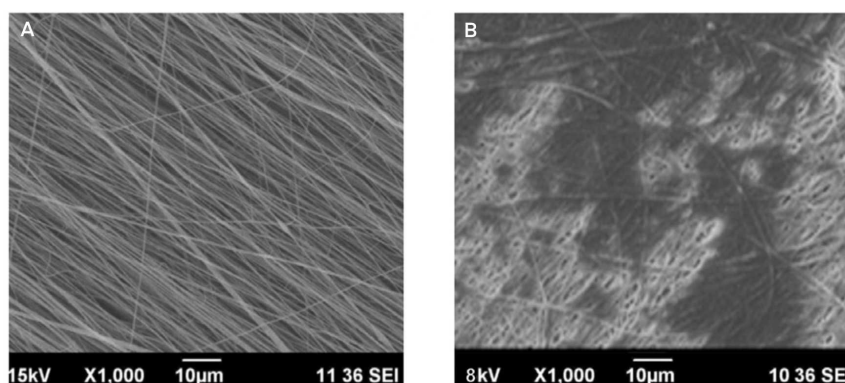


Fig. 9 Immagini SEM della morfologia superficiale di *scaffold* a base di PLLA/gelatina (A) prima della semina di SMCs e (B) dopo 120 ore in coltura, Shalumon et al. [23]

Tuttavia va ricordato che la presenza di gelatina può aumentare significativamente la velocità di degradazione dello *scaffold*, particolarmente in condizioni fisiologiche, perciò sono necessarie ulteriori indagini per garantire l'integrità del costruito in vivo.

3.2.2 MELT ELECTROWRITING

Incorporando i principi di elettrodinamica sfruttati dall'elettrospinning ai principi convenzionali dell'AM, si ottiene la tecnica di *Melt Electro Writing* (MEW), applicata alla produzione di vasi sanguigni artificiali in virtù della sua elevata governabilità, che consente di ottenere manufatti di grande precisione potendo depositare le fibre in geometrie varie e complesse. L'impiego di polimeri fusi anziché in soluzione permette di superare le limitazioni osservate nella tecnica precedente legate alla presenza del solvente. In particolare, il getto fuso ha minor conducibilità elettrica associata alla minor densità di carica superficiale e maggiore viscosità, che riduce l'instabilità che caratterizzava il getto con il solvente [2].

Il getto più stabile può quindi essere depositato con maggior facilità dal collettore sul substrato prescelto, che nel caso di costrutti di forma tubolare è costituito da un mandrino cilindrico.

La possibilità di monitorare e controllare parametri come la temperatura di fusione del polimero, la tensione applicata e la velocità di traslazione del collettore assicura l'elevata riproducibilità dei manufatti prodotti con questa tecnica e la possibilità di ottenere precise caratteristiche di porosità, dimensioni e forma delle fibre, nonché angoli di deposizione delle stesse. In Fig. 10 sono riportati alcuni esempi della complessa architettura ottenibile dalla deposizione delle fibre via MEW.

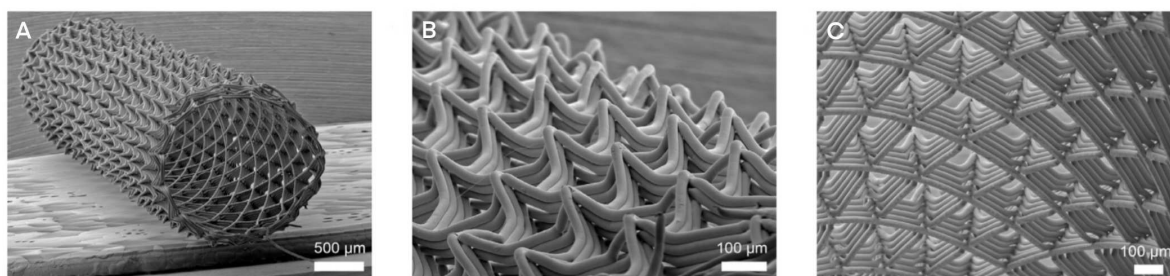


Fig. 10 Immagini SEM di *scaffold* in PCL fabbricato via MEW, con fibre disposte ad angoli di 20°, McColl et al. [24]

Essendo programmati da uno specifico codice (G-code) [2], i movimenti di traslazione e rotazione del collettore possono essere guidati in maniera da ottimizzare la porosità per favorire la distribuzione cellulare. A tal proposito è interessante riportare i risultati ottenuti da Paxton et al. [25] riguardo la correlazione tra l'allineamento dei pori e la proliferazione delle cellule. Come evidenziato dalle seguenti immagini si osserva una miglior crescita cellulare sugli *scaffold* a pori non allineati (Fig. 11B), piuttosto che in quelli a pori allineati (Fig. 11A).

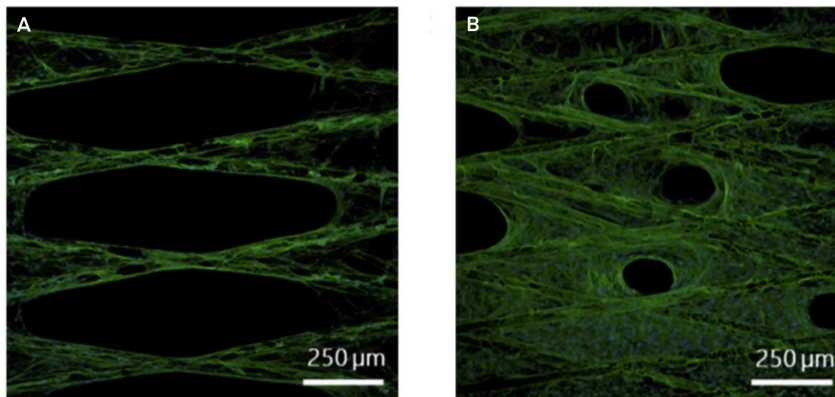


Fig. 11 Proliferazione cellulare evidenziata da colorazione DAPI/Phalloidin su *scaffold* a base di PLC con (A) pori allineati e (B) pori non allineati, da Paxton et al. [25]

Il G-code può anche essere predisposto per ottenere *scaffold* con proprietà anisotrope grazie ad un'opportuna disposizione delle fibre. Quest'ultima caratteristica è particolarmente rilevante in quanto consente di ottenere un manufatto con deformabilità e risposta tensione-deformazione molto simili a quelle dei vasi sanguigni naturali e quindi di ridurre sostanzialmente la probabilità che insorgano complicazioni al sito di anastomosi [2].

Pertanto la MEW si presenta come una delle tecniche migliori nella produzione di *scaffold*, tuttavia non è esente da limitazioni per quanto riguarda i materiali impiegabili, generalmente polimeri sintetici termoplastici con punti di fusione sotto i 200°C e caratteristiche appropriate di conducibilità e viscosità, sebbene quest'ultima possa essere in qualche caso ottimizzata tramite trattamenti termici preventivi. Fra i materiali menzionati nel capitolo precedente è il caso del PCL, PP e PLA [2].

Attualmente tale tecnica è di utilizzo limitato, soprattutto per il suo sviluppo relativamente recente che ne comporta la difficile reperibilità della strumentazione per ora prodotta su richiesta, tuttavia essa presenta tutte le caratteristiche per essere oggetto di ulteriori studi che ne assicurino il continuo sviluppo in una tecnica sempre più altamente specializzata.

CONCLUSIONI

Visti i significativi sviluppi nello studio dei biomateriali, nelle tecniche di semina e coltura cellulare, oltre che in quelle di produzione degli scaffold, appare chiaro che l'ingegneria tissutale si presenta come un settore emergente che sta assumendo sempre maggior rilevanza.

Il suo obiettivo nell'ambito delle protesi vascolari è quello di rispondere alla richiesta di vasi sanguigni artificiali che possano integrarsi in vivo per sostituire i quelli malati o danneggiati. Perché ciò avvenga con successo è necessario che i condotti artificiali siano in primo luogo biocompatibili e presentino caratteristiche biologiche e meccaniche il più possibile comparabili a quelle dei corrispettivi naturali, così da evitare risposte infiammatorie e/o immunitarie, eventi trombotici o deformazioni che possano comprometterne la funzionalità sotto il flusso pulsatile del sangue.

A questo scopo, si può agire in primo luogo con un'accurata selezione dei materiali per lo *scaffold*, siano essi naturali o sintetici, tenendo presente che in generale i primi garantiscono una migliore biocompatibilità, ma sono spesso caratterizzati da scarse proprietà meccaniche; mentre i secondi permettono di ottenere *scaffold* con elevate prestazioni meccaniche, ma con profili di adesione cellulare non sempre ottimali. Da cui la nascita di approcci che fanno uso di scaffold ibridi, che possono rivelarsi il giusto compromesso per ricavare il meglio da entrambe le categorie.

In secondo luogo, si può intervenire selezionando le cellule più adatte e gli opportuni fattori biochimici che ne favoriscano migrazione, adesione e crescita, garantendo la corretta formazione del nuovo tessuto vascolare sul supporto fornito dallo *scaffold*.

Infine, non si può non tenere conto dell'importanza dell'innovazione nel campo delle tecniche di produzione, le quali determinano il grado di risoluzione ottenibile per l'architettura degli *scaffold*. Tra queste le tecnologie AM emergono per l'elevato grado di precisione e complessità ottenibili nelle geometrie degli *scaffold*, oltre che per l'ampio *range* di materiali che possono impiegare, inclusi *bioink* con formulazioni personalizzabili e materiali fotosensibili in grado di rispondere a stimoli luminosi.

Tuttavia, ad oggi non sono ancora disponibili vasi artificiali in grado di eguagliare la rivascularizzazione autologa, pertanto lo sviluppo di tecnologie sempre più avanzate in grado di produrre su larga scala e a costi contenuti vasi artificiali sempre più fedeli a quelli nativi sarà determinante per la diffusione di tale disciplina e il suo utilizzo in ambito clinico.

BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

- [1] D.M. Solis, A. Czekanski (2021), *3D and 4D additive manufacturing techniques for vascular-like structures – A review*, *Bioprinting*, 25, 1-13, online <https://doi.org/10.1016/j.bprint.2021.e00182>.
- [2] A. Weekes, N. Bartnikowski, N. Pinto et al. (2021), *Biofabrication of small diameter tissue-engineered vascular grafts*, *Acta Biomaterialia*, 138, 92-111, online <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.11.012>.
- [3] K.Ma, Bloodvessels. Wikimediacommons. <https://commons.wikimedia.org/wiki/User:Kelvin13> (consultazione 2022)
- [4] C. Di Bello, A. Bagno (2014), *Biomateriali dalla scienza dei materiali alle applicazioni cliniche*, Patron Editore, pp. 117-174, 321-350, 175-205.
- [5] S.Jarvis (2018), *Vascular system 1: anatomy and physiology*, *Nurs.Times*, 40–44, online <https://www.nursingtimes.net/clinical-archive/cardiovascular-clinical-archive/vascular-system-1-anatomy-and-physiology-26-03-2018/> .
- [6] H. Jordan, L.L. Maurillo, T. Wang (2022), *Current Progress in Vascular Engineering and Its Clinical Applications*, *Cells* 11, 493, 1-15, online <https://doi.org/10.3390/cells11030493>.
- [7] J. Luo, L. Qin, L. Zhao, L. Gui, M.W. Ellis, Y. Huang, M.H. Kural, J.A. Clark, S. Ono, J. Wang, Y. Yuan, S.M. Zhang, X. Cong, G. Li, M. Riaz, C. Lopez, A. Hotta, S. Campbell, G. Tellides, A. Dardik, L.E. Niklason, Y. Qyang (2020), *Tissue-engineered vascular grafts with advanced mechanical strength from human iPSCs*, *Cell Stem Cell*, 26 (2), 251–261 .e8, online <https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.12.012>.
- [8] A.S. Lee, C. Tang, M.S. Rao, I.L. Weissman, J.C. Wu (2013), *Tumorigenicity as a Clinical Hurdle for Pluripotent Stem Cell Therapies*, *Nat. Med.*, 19, 998–1004, online <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3967018/>.
- [9] J.S. Weinbaum, D.G. Haskett, T.F. Mandelkern, D.A. Vorp, (2020) *Advances in Cell Seeding of Tissue Engineered Vascular Grafts*, *Tissue Engineered Vascular Grafts*, Springer, pp. 295–319.
- [10] S.R. Meyers, M.W. Grinstaff (2011), *Biocompatible and bioactive surface modifications for prolonged in vivo efficacy*, *Chemical Reviews*, 112 (3), 1615–32, online <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3878818/>.
- [11] C.B. Weinberg, E. Bell, A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells, *Science* 231 (80) (1986) 397–400.

- [12] P.M. Crapo, T.W. Gilbert, S.F. Badylak, An overview of tissue and whole organ decellularization processes, *Biomaterials* 32 (12) (2011) 3233–3243, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.01.057>.
- [13] [https://it.wikipedia.org/wiki/Collagene#/media/File:Collagen_biosynthesis_\(it\).JPG](https://it.wikipedia.org/wiki/Collagene#/media/File:Collagen_biosynthesis_(it).JPG) (consultazione 2022).
- [14] https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structures-of-PGA-PLA-and-PLGA-polymers-n-number-of-repeat-units-in-PLA-and_fig1_251509220 (consultazione 2022).
- [15] Y. Jung, H. Ji, Z. Chen, H. Fai Chan, L. Atchison, B. Klitzman, G. Truskey, K.W. Leong, (2015), *Scaffold-Free, Human Mesenchymal Stem Cell-Based Tissue Engineered Blood Vessels*, *Sci. Rep.*, 5, 15116, online <https://www.nature.com/articles/srep15116>.
- [16] K. Kuribayashi-Shigetomi, H. Onoe, S. Takeuchi, Cell origami: self-folding of three-dimensional cell-laden microstructures driven by cell traction force, *PLoS One* 7 (2012) 1–8.
- [17] Y. Xu, et al. (2018), *A novel strategy for creating tissue-engineered biomimetic blood vessels using 3D bioprinting technology*, *Materials (Basel)*, 11, online <https://www.mdpi.com/1996-1944/11/9/1581/htm>.
- [18] V.K. Lee, et al. (2014), *Generation of multi-scale vascular network system within 3D hydrogel using 3D bio-printing technology*, *Cell. Mol. Bioeng.* 7, 460–472, online <https://link.springer.com/article/10.1007/s12195-014-0340-0>.
- [19] J. Schönberg, et al. (2018), *Engineering biofunctional in vitro vessel models using a multilayer bioprinting technique*, *Sci. Rep.*, 1–13, online <https://www.nature.com/articles/s41598-018-28715-0>.
- [20] C. Norotte, F.S. Marga, L.E. Niklason, G. Forgacs, Scaffold-free vascular tissue engineering using bioprinting, *Biomaterials* 30 (30) (2009) 5910–5917, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.06.034>.
- [21] X. Cui, T. Boland, Human microvasculature fabrication using thermal inkjet printing technology, *Biomaterials* 30 (2009) 6221–6227.
- [22] S.J. Lee, J.J. Yoo, G.J. Lim, A. Atala, J. Stitzel, In vitro evaluation of electrospun nanofiber scaffolds for vascular graft application, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 83A (4) (2007) 999–1008, <https://doi.org/10.1002/jbm.a>.
- [23] K.T. Shalumon, S. Deepthi, M.S. Anupama, S.V. Nair, R. Jayakumar, K.P. Chen-nazhi (2015), *Fabrication of poly (l-lactic acid)/gelatin composite tubular scaffolds for vascular tissue engineering*, *Int. J. Biol. Macromol.* 72, 1048–1055, online <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.09.058>.

[24] E. McColl, J. Groll, T. Jungst, P.D. Dalton (2018), *Design and fabrication of melt electrowritten tubes using intuitive software*, Mater. Des. 155, 46–58, online <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2018.05.036>.

[25] N.C. Paxton, M. Lanaro, A. Bo, N. Crooks, M.T. Ross, N. Green, K. Tetsworth, M.C. Allenby, Y.T. Gu, C.S. Wong, S.K. Powell, M.A. Woodruff (2020), *Design tools for patient specific and highly controlled melt electrowritten scaffolds*, J. Mech. Behav. Biomed. Mater. 105, 103695, online <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2020.103695>.