Politecnico di Torino

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica
A. A. 2021/2022
Sessione di Laurea Magistrale: luglio 2022

Realizzazione di un modello di barriera alveolo-capillare che simula il movimento respiratorio tramite l'implementazione di un sistema di attuazione meccanica

Relatore:
Prof. Gianluca Ciardelli
Correlatrice:
Prof.ssa Chiara Tonda-Turo
Tutor di laboratorio:
Dott.ssa Michela Licciardello

Candidato:
Benella Matteo

"Alla mia famiglia.

A chi ci guarda e sostiene da lassù.

Alla persona con cui voglio condividere il resto della vita.

Al nostro futuro che scalpita e si fa sempre più nitido."

INDICE

ABSTRACT 6
CAPITOLO 1: INTRODUZIONE 7
1.1 ANATOMIA E FISIOLOGIA POLMONARI 7
1.1.1 LA BARRIERA ALVEOLO-CAPILLARE 13
1.1.2 PATOLOGIE DELLA BARRIERA ALVEOLO-CAPILLARE 16
1.2 DALLA MEDICINA TRADIZIONALE ALLA MEDICINA DI PRECISIONE 23
1.3 ORGANIZZAZIONE DI PRECLINICAL E CLINICAL TRIALS 24
1.3.1 MODELLI in vivo 24
1.3.2 Modelli *in-vitro* 27
1.3.2.1 COLTURE CELLULARI 2D 31
1.3.2.2 METODO DI COLTURA IN TRANSWELL® 33
1.3.3 MODELLI DI COLTURA AVANZATI 35
1.3.3.1 ORGANOIDI 35
1.3.3.2 SFEROIDI 37
1.4 SCAFFOLD 39
1.4.1 MATERIALI UTILIZZATI 41
1.5 BIOREATTORI 44
1.6 SISTEMI MICROFLUIDICI 48
1.6.1 ORGAN-ON-CHIP 50
CAPITOLO 2: MATERIALI E METODI 54
2.1 MATERIALI 54
2.1.1 BIOREATTORE IVTech S.R.L. 54
2.1.2 GELATINA (GL) 58
2.1.3 γ-GLICIDOSSIPROPILTRIMETOSSISILANO (GPTMS) 60
2.1.4 POLI- ε -CAPROLATTONE (PCL) 63
2.1.5 FALLOIDINA 64
2.1.6 4'-6-DIAMIDIN2-FENILDOLO 65
2.2 METODI 65
2.2.1 CURVA DI CALIBRAZIONE DEL LivePa 65
2.2.1.1 SET UP BIOREATTORE E MODALITÁ DI MISURA DELLA PRESSIONE 65
2.2.1.2 RACCOLTA DEI DATI 66
2.2.1.3 MISURAZONI IN CAMERA BASALE 68

2.2.1.4 MISURAZIONI IN CAMERA APICALE 69
2.2.2 ELETTROSPINNING 70
2.2.2.1 PROCESSO DI ELECTROSPINNING DELLA MEMBRANA IN PCL-GL 72
2.2.3 CARATTERIZZAZIONE DELLE MEMBRNA IN PCL/GL 73
2.2.3.1 ANALISI DI PERMEABILITÁ 73
2.2.3.2 TEST DI DEGRADAZIONE DELLA MEMBRANA IN PCL/GL 75
2.2.3.3 CARATTERIZZAZIONE DELLA DEFORMAZIONE DELLA MEMBRANA IN LB2 76
2.2.4 ANALISI STATISTICA 78
2.2.5 SEMINA CELLULARE 78
2.2.5.1 SEMINA DELLA CAMERA BASALE 79
2.2.5.2 SEMINA DELLA CAMEA APICALE 80
2.2.5.3 SEMINA DELLE CELLULE IN STATICO 81
2.2.6 STUDIO CON LE CELLULE ALL'INTERNO DELL'LB2 81
2.2.7 OSSERVAZIONE DELLE CELLULE 82
2.7.1 PROTOCOLLO DI FISSAGGIO E MARCATURA DELLE CELLULE 82
CAPITOLO 3: RISULTATI E DISCUSSIONE 84
3.1 CURVA DI CALIBRAZIONE DEL LIVE PA 84
3.1.1 MISURAZIONI IN CAMERA BASALE 84
3.1.2 MISURAZIONI IN CAMERA APICALE 88
3.2 ELETTROSPINNING 90
3.3 CARATTERIZZAZIONE DELLE MEMBRANA IN PCL/GL 90
3.3.1 ANALISI DI PERMEABILITÁ 91
3.3.2 TEST DI DEGRADAZIONE DELLA MEMBRANA IN PCL/GL 91
3.3.3 CARATTERIZZAZIONE DELLA DEFORMAZIONE DELLA MEMBRANA IN LB2 92
3.4 ANALISI STATISTICA 97
3.4.1 CAMERA BASALE 97
3.4.2 CAMERA APICALE 99
3.4.3 CAMERA BASALE CON MEMBRANA IN PCL/GL 101
3.5 SEMINA CELLULARE 102
CAPITOLO 4: CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI 105
RIFERIMENTI 108
RINGRAZIAMENTI 119

ABSTRACT

Lung alveolar-capillary barrier is a thin membrane where pulmonary endothelium and epithelium face each other, creating a gaseous exchange surface between blood and air driven by concentration gradients of oxygen and carbon dioxide. Lung tissues are directly exposed to external air, and, for this reason, also to possible toxic particles and pathogens, which could lead to the development of serious pathologies such as pulmonary cancer and chronic obstructive broncho pneumopathy (COBP).

The aim of our work is to reproduce a model of alveolar capillary barrier into a bicameral bioreactor to mimic the dynamic respiration thought a novel bioengineered platform. As culture chamber we used the LiveBox2 (IVTech S.R.L., Lucca. Italy) a bicameral bioreactor, with a porous membrane in between, and connected to a peristaltic pump for the circulating liquid. To replicate the breathing movements, we used the LivePa (IVTech S.R.L., Lucca. Italy), a mechanic actuator, which can apply a static overpressure blocking and obstructing the exit tube of one of the LiveBox2 chambers. First, a complete calibration of the LivePa connected to the system was performed, monitoring the overpressure in the LiveBox2 occluding first the basal chamber exit tube then from the apical one, inserting in the middle a commercial polyethylene terephthalate (PET) membrane. Then, the PET commercial membrane was replaced with a biomimetic electrospun Poly-ε-Caprolactone (PCL)/Gelatine (GL) membrane. After a characterization of the mat stability inside the bioreactor, the membrane was tested in basal chamber and its performances were compared with those of PET membrane. The comparison of the two membranes demonstrated that with the membrane in PET the overpressure increased faster than with the one in PCL/GL. However, pressure profile grew exponentially as the tube obstruction increased for the two membranes tested.

Then, cellular tests were performed under liquid-liquid interface condition, to verify cellular adhesion on both sides of PCL/GL membrane. Cell co-culture was implemented by seeding epithelial cell line A549 in the upper chamber and human endothelial cells HULEC-5a bottom chamber of the LiveBox2, respectively. Cells were cultured applying three different conditions inside the LiveBox2 chambers, to evaluate the single stimuli contribution: static, dynamic with only flow and dynamic with flow and occlusion. A future perspective will be the transition from this system to an air-liquid interface (ALI) model which will better mimic the physiological condition of the blood-air barrier.

CAPITOLO 1: INTRODUZIONE

1.1 ANATOMIA E FISIOLOGIA POLMONARI

I polmoni sono organi pari dalla consistenza spongiosa ed elastica; sono situati nella cavità toracica. La loro forma può essere ricondotta ad un cono privato del terzo mediale con una zona apicale smussata (Barbatelli et al., 2018). I polmoni hanno una faccia che si rapporta con il diaframma, una faccia costovertebrale, rivolta quindi verso vertebre e coste ed una posta medialmente, al cui centro si colloca *l'ilio polmonare*, ovvero quella parte attraversata da bronchi, nervi e vasi sanguigni (Barbatelli et al., 2018). Le dimensioni polmonari si aggirano intorno ai 25 cm di lunghezza massima, 10 cm di larghezza e 15 cm di profondità (Barbatelli et al., 2018). Il polmone destro è più grande del sinistro dato che quest'ultimo condivide lo spazio emi toracico con il cuore (Barbatelli et al., 2018) in una zona che prende il nome di *incisura cardiaca*[1] (Barbatelli et al., 2018).

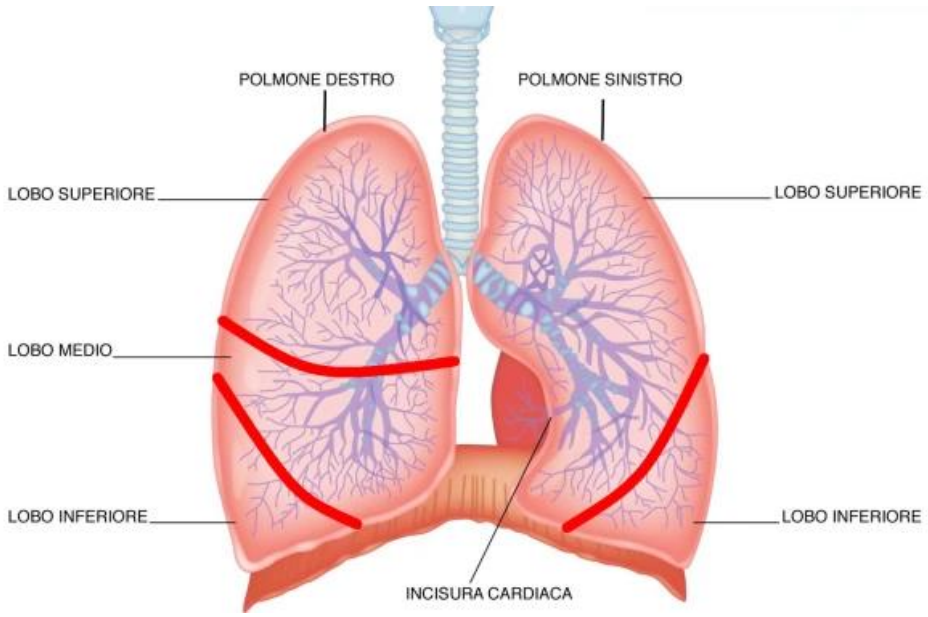


Figura 1: Polmoni destro e sinistro

I polmoni sono ricoperti da una sacca pleurica, una struttura formata da due foglietti di cellule epiteliali e tessuto connettivo (Barbatelli et al., 2018). Questi due foglietti pur essendo indipendenti fra di loro entrano in contatto a livello dell'ilio

[1] Incisura cardiaca: Largo solco collocato nel lobo superiore del polmone sinistro e anteriormente alla *fossa cardiaca*, lo spazio occupato da cuore e pericardio. Viene anche chiamato *solco cardiaco* del polmone sinistro o *fovea cardiaca*.

polmonare, e facilitano il movimento polmonare durante la respirazione (Barbatelli et al., 2018).
La sacca pleurica si organizza su tre livelli:

- **Pleura viscerale**: a contatto diretto con il polmone andandolo a ricoprire esternamente(Barbatelli et al., 2018).

- **Pleura parietale**: è adesa alla gabbia toracica, con lo scopo di separare la zona polmonare da quella toracica (Barbatelli et al., 2018).

- **Spazio intra-pleurico**: è collocata fra la viscerale e la parietale, ed è una zona a pressione negativa contenente il liquido pleurico. Il liquido è fondamentale in quanto consente la dilatazione polmonare durante la respirazione (Barbatelli et al., 2018).

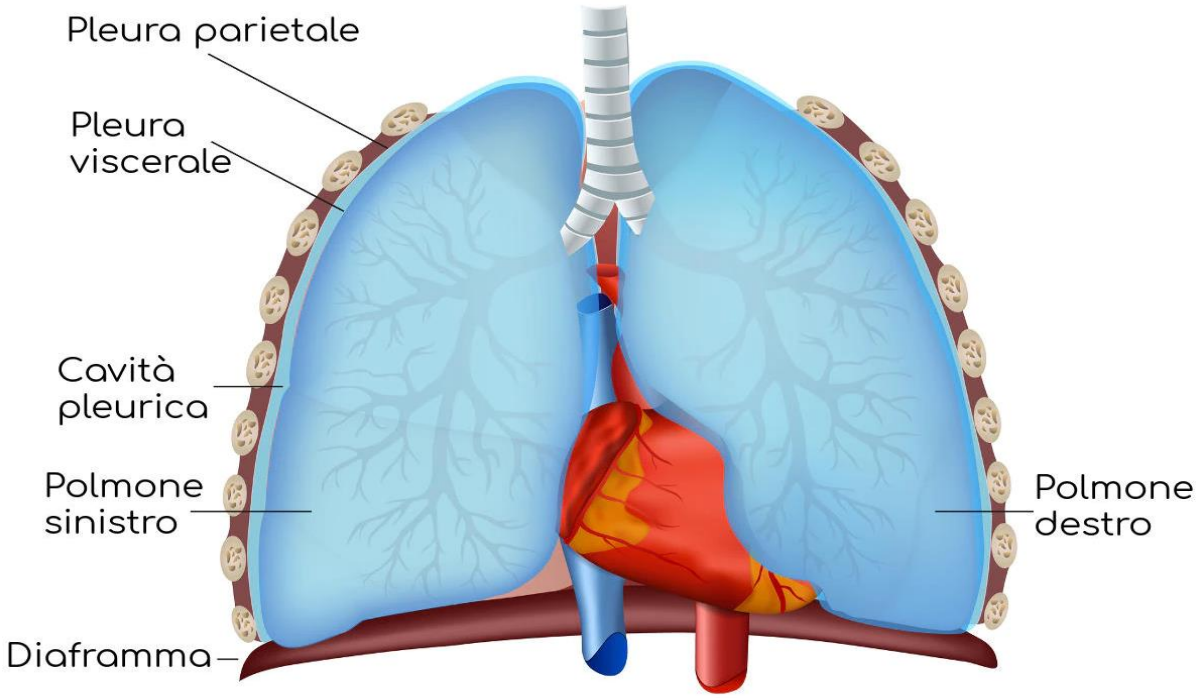


Figura 2: pleure

La superficie polmonare presenta delle *scissure* (o solchi) *interlobari*, due a destra (*obliqua* o principale e *orizzontale* o secondaria) ed una sinistra (*obliqua*) (Barbatelli et al., 2018). Questi solchi si estendono in profondità nel polmone fino al livello dell'ilio e consentono di individuare i *lobi*, che sono delle strutture gerarchiche dei polmoni

e ne esistono tre a destra (superiore, medio ed inferiore) e due a sinistra (superiore e inferiore) (Barbatelli et al., 2018).
Ogni *lobo* è suddiviso *in zone (o segmenti) broncopolmonari* piramidali con apice verso l'ilio; le *zone* sono dieci per ogni polmone e si distribuiscono nel seguente modo:

- **Polmone destro**: tre zone per il lobo superiore, due per quello medio e cinque per quello inferiore (Barbatelli et al., 2018).

- **Polmone sinistro**: cinque segmenti per il lobo superiore e cinque per quello inferiore (Barbatelli et al., 2018).

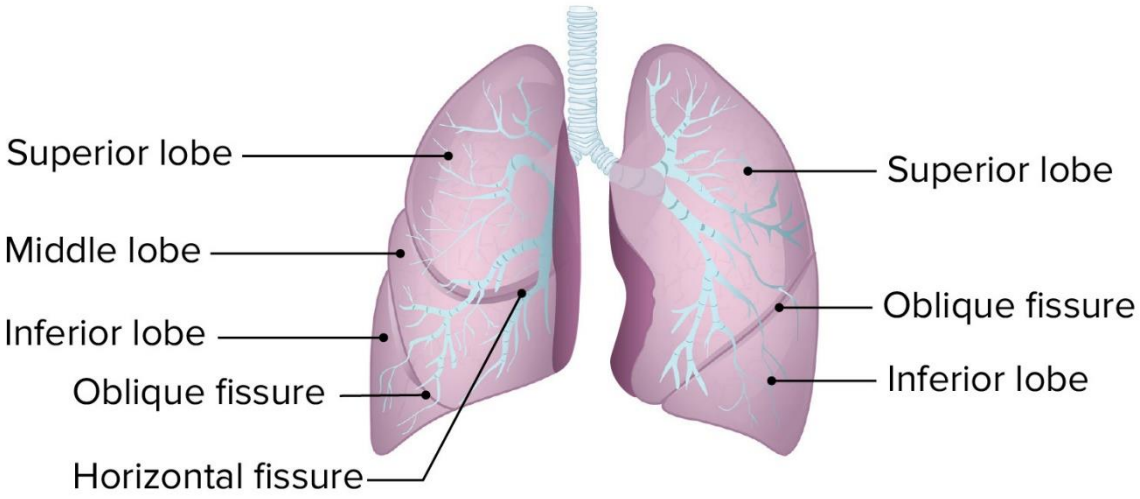


Figura 3: Lobi e fessure

Ogni segmento è dotato di un *peduncolo vascolobronchiale,* che lo rende indipendente dalle strutture anatomiche adiacenti per la presenza di un ramo dell'arteria polmonare (segmentale o zonale), di un bronco (segmentale o zonale) e di una rete venosa che circonda il segmento (Barbatelli et al., 2018).
I segmenti, inoltre, si suddividono in *lobuli,* che a loro volta sono interconnessi fra di loro grazie a tessuto connettivo interstiziale, e tutti insieme vanno a formare il *parenchima polmonare* (Barbatelli et al., 2018). I lobuli sono dotati di un peduncolo vascolo-bronchiale e la loro dimensione varia in base alla loro collocazione; più nello specifico tendono ad essere più grandi alla base del polmone e vanno a rimpicciolirsi sempre di più man mano che ci si avvicina all'apice (Barbatelli et al.,

2018). La loro forma è quella di una piramide allungata con la base esposta sulla superficie del polmone ed il vertice rivolto verso l'ilo (Barbatelli et al., 2018).
Quindi la struttura polmonare è suddivisa in tre sottostrutture anatomiche: lobuli, segmenti ed alveoli tutte fondamentali per il corretto funzionamento della respirazione (Barbatelli et al., 2018).
La respirazione è un meccanismo di scambio di ossigeno e anidride carbonica mosso da gradiente di concentrazione fra sangue ed aria che entra nei polmoni. L'aria, prima di interagire con il sangue, viene inalata nelle vie aree superiori e da qui entra nei bronchi (Barbatelli et al., 2018).
I bronchi, nei due polmoni, si organizzano in quello che viene chiamato *albero bronchiale,* data la morfologia ramificata dei *bronchi intrapolmonari (Barbatelli et al., 2018).* Tale ramificazione ha inizialmente una struttura gerarchica di tipo monopodiale[2], invece nella parte terminale assume una morfologia dicotomica (Barbatelli et al., 2018). Quindi per ciascun polmone si ha un lobo principale, da cui si diramano bronchi secondari che permettono il passaggio da una struttura a fusto semplice ad una con biforcazioni(Barbatelli et al., 2018).
Dal bronco principale si originano i *bronchi lobari,* che vanno a ventilare i rispettivi lobi. Quindi a destra si diramano tre bronchi lobari (superiore, medio ed inferiore), mentre nel polmone sinistro ce ne sono due (superiore e inferiore) (Barbatelli et al., 2018).
Dai *bronchi lobari* si generano i *bronchi segmentali (o zonali),* che sono uno per ogni segmento; quindi, ce ne sono dieci a destra ed altrettanti a sinistra (Barbatelli et al., 2018). A loro volta i *bronchi zonali* si dividono in *bronchi lobulari* fino ad arrivare ai *bronchioli interlobulari* e ai *bronchioli intralobulari* (Barbatelli et al., 2018)*;* i primi percorrono tutta la zona di connettivo lasso tra i lobuli, gli altri entrano nei lobuli per ventilarli (Barbatelli et al., 2018).
Ogni *bronco lobulare,* dunque, si va a ramificare riducendosi sempre di più in diametro, fino a dare origine ai *bronchioli terminali,* che infatti hanno un diametro inferiore a un millimetro, ed ognuno dei quali va a ventilare un *acino* (Barbatelli et al., 2018).

[2] Monopodiale: con un asse principale da cui si dipartono le varie ramificazioni, una struttura detta anche a fusto semplice.

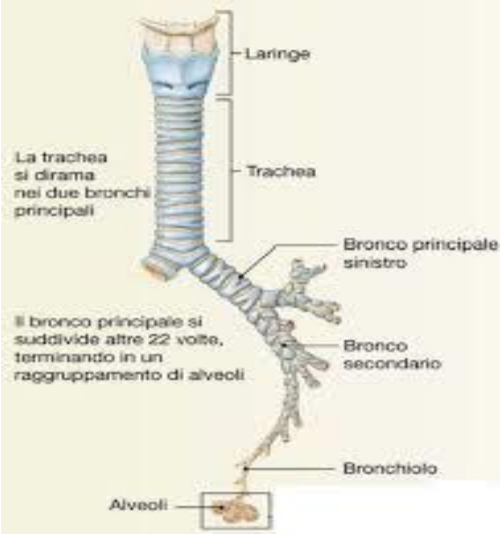


Figura 5: albero bronchiale

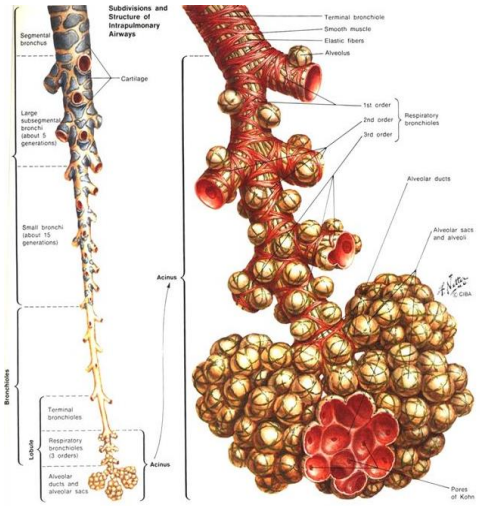


Figura 6: acino

L'*acino* è l'unità funzionale del polmone e ne costituisce l'ultimo livello dell'organizzazione gerarchica. All'interno di queste strutture anatomiche, gli *alveoli terminali* si biforcano in *alveoli respiratori*, i quali hanno delle pareti con delle dilatazioni sacciformi chiamate *alveoli polmonari.* Questi ventilano 2-10 *sacchi alveolari,* che sono formati da un *dotto alveolare*, il quale, a sua volta, è costituito da numerosissimi alveoli; in ogni *acino* si trovano da 500 a 2000 *alveoli polmonari* (Barbatelli et al., 2018; Tenenbaum-Katan et al., 2018). Più precisamente, gli *alveoli polmonari* sono delle strutture a forma di "grappolo d'uva", formate da due fenotipi cellulari chiamati pneumociti di tipo 1 e 2 (Barbatelli et al., 2018).
All'interno degli alveoli, inoltre, si trovano i macrofagi capillari (Barbatelli et al., 2018).
Lo scambio gassoso fra sangue capillare ed aria alveolare, dunque, è regolato dalla pressione e nella respirazione ne agiscono di diverse tipologie:

- **Pressione atmosferica**: è la pressione dell'aria che entra nei polmoni, il cui valore tipico è di 760 mmHg a livello del mare ma si abbassa con l'aumentare della quota.

- **Pressione intra-alveolare**: è la pressione dell'aria negli alveoli. Mediamente si aggira intorno ai 760 mmHg ma aumenta con l'espirazione e diminuisce con l'ispirazione per consentire rispettivamente l'uscita e l'ingresso di aria nei polmoni.

- **Pressione intrapleurica**: il suo valore rispetto alla pressione atmosferica è -4 mmHg e varia in base alla fase respiratoria, ma è sempre inferiore alla pressione intra-alveolare.

- **Pressione trans polmonare**: è determinata della forza di dilatazione polmonare. Il valore di questa pressione viene restituito dalla differenza fra la pressione alveolare e la pressione intrapleurica.

Grazie ai gradienti pressori si genera quindi il meccanismo di scambio gassoso fra sangue ed aria.
Inoltre, nel percorso che l'aria segue per raggiungere la zona di scambio gassoso, si possono individuare i seguenti volumi:

- **Volume corrente:** è la quantità volumetrica d'aria che entra ed esce dai polmoni in un atto respiratorio non forzato (Barbatelli et al., 2018).

- **Volume di riserva espiratoria/inspiratoria**: è il volume d'aria che può ancora essere espirato/inspirato al termine di un atto espiratorio/inspiratorio non forzato (Barbatelli et al., 2018).

- **Volume residuo**: è il volume d'aria che rimane nei polmoni al termine di un'espirazione massimale (Barbatelli et al., 2018).

Dai volumi della respirazione si possono ricavare delle grandezze di riferimento nella valutazione dell'atto respiratorio, in particolare la **capacità inspiratoria** (somma fra volume corrente e volume di riserva inspiratoria), la **capacità vitale** (somma fra i volumi di riserva espiratoria ed inspiratoria), la **capacità funzionale residua** (somma fra volume di riserva espiratoria e volume residuo) e in fine la **capacità polmonare residua** (somma fra tutti i volumi polmonari) (Barbatelli et al., 2018).

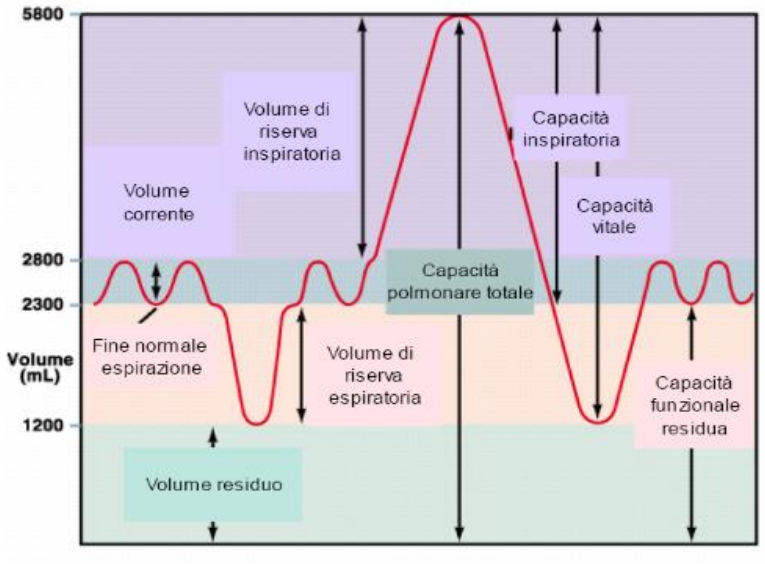


Figura 7: volumi di respirazione

I polmoni, col tempo, mutano il proprio colore, che passa da un tono rosa chiaro, ad uno più scuro per il depositarsi di detriti della respirazione che verranno poi fagocitati dai macrofagi[3]. I macrofagi alveolari sono molto importanti, perché devono mantenere l'omeostasi polmonare in zona di confine con il mondo esterno e per questo la loro attività è molto elevata.

1.1.1 LA BARRIERA ALVEOLO-CAPILLARE

La barriera alveolo-capillare è la membrana che regola lo scambio gassoso fra aria alveolare e sangue capillare. Le cellule che compongono questa membrana sono prevalentemente gli pneumociti di Tipo 1 e di Tipo 2, chiamati anche rispettivamente cellule alveolari di tipo I (ATI) e cellule alveolari di tipo II (ATII). Gli ATI costituiscono l'8% delle cellule presenti nei polmoni ed il 90% della struttura alveolare, e contribuiscono a formare il suo epitelio. Quest'ultimo presenta una morfologia piatta e monostratificata.
Gli pneumociti di tipo I hanno pochi organelli e sono in grado di trans differenziare in pneumociti di tipo II. Gli ATI hanno un ruolo chiave nello scambio gassoso ma

[3] Macrofagi: sono cellule del sistema immunitario appartenenti alla famiglia dei fagociti. Essi svolgono il ruolo di "spazzini" del corpo umano fagocitando eventuali agenti patogeni o detriti cellulari.

allo stesso tempo regolano la proliferazione cellulare, il trasporto di acqua grazie alle acquaporine[4], in più regolano anche l'attività dei macrofagi ed i *phatways di signaling* nelle zone polmonari periferiche (Bhattacharya & Matthay, 2013; Tenenbaum-Katan et al., 2018). Le cellule ATII invece costituiscono il 16% del parenchima polmonare, e appena il 7% dell'epitelio dell'alveolo (Bhattacharya & Matthay, 2013; Tenenbaum-Katan et al., 2018). Hanno dimensioni maggiori rispetto alle ATI, sono a forma cubica con architettura lamellare, e possiedono dei microvilli in zona apicale. La funzione degli pneumociti di Tipo II è quella di secernere del surfattante tensioattivo che va a regolare la tensione superficiale della parete alveolare garantendo una superficie respiratoria polmonare sufficiente a consentire i movimenti di contrazione ed espansione nella respirazione, andando a prevenire il collasso alveolare impedendone l'eccessiva distensione (Bhattacharya & Matthay, 2013; Tenenbaum-Katan et al., 2018).

Questi due fenotipi cellulari concorrono insieme a formare la linea epiteliale della barriera polmonare e svolgono un ruolo chiave nel mantenimento dell'omeostasi all'interno dei polmoni, generando una barriera altamente selettiva per proteine e soluti (Bhattacharya & Matthay, 2013).

È possibile, quindi, individuare due parti della barriera alveolo-capillare: quella alveolare, che rappresenta uno scudo meccanico verso insulti da parte di agenti patogeni esterni ed è cruciale per mantenere il bilancio fluidico polmonare, e la parte capillare, che è a diretto contatto con quella alveolare e diretta responsabile dello scambio gassoso (Bhattacharya & Matthay, 2013; Tenenbaum-Katan et al., 2018). Fra di esse, adesi alle loro superfici, si trovano i macrofagi alveolari (AM), e negli interstizi, fra gli AM, risiedono i fibroblasti[5]. Questa zona prende il nome di *spazio interstiziale,* e collega la lamina basale dell'epitelio alveolare all'endotelio capillare. I fibroblasti mantengono l'integrità strutturale del tessuto e secernono piccole quantità di matrice extracellulare (ECM) (Bhattacharya & Matthay, 2013; Tenenbaum-Katan et al., 2018).

I fibroblasti, nel tempo o in seguito ad un danno, mutano in miofibroblasti. Quest'ultimi sono in grado di migrare nella zona di un eventuale danno, dove vanno a secernere componenti della ECM per rigenerare tutte le funzionalità del tessuto. Inoltre, i miofibroblasti secernono anche elastina, una proteina della ECM, che

[4] Acquaporine: sono delle proteine di membrana che facilitano il flusso veloce di molecole d'acqua fuori e dentro le cellule.

[5] Fibroblasti: sono cellule tipiche del tessuto connettivo e sono deputati alla produzione di sostanze che formano la matrice extracellulare. I fibroblasti hanno un citoplasma vacuolizzato attorno ad un nucleo colorato e composto da uno o due nucleoli. I fibroblasti attivi sono caratterizzati dall'abbondante reticolo endoplasmatico, mentre quelli inattivi sono piccoli ed allungati, e sono formati da un reticolo endoplasmatico ridotto.

conferisce l'elasticità al *parenchima polmonare*, cosicché il polmone abbia le giuste proprietà meccaniche per svolgere tutti i movimenti della respirazione (Bhattacharya & Matthay, 2013; Tenenbaum-Katan et al., 2018).

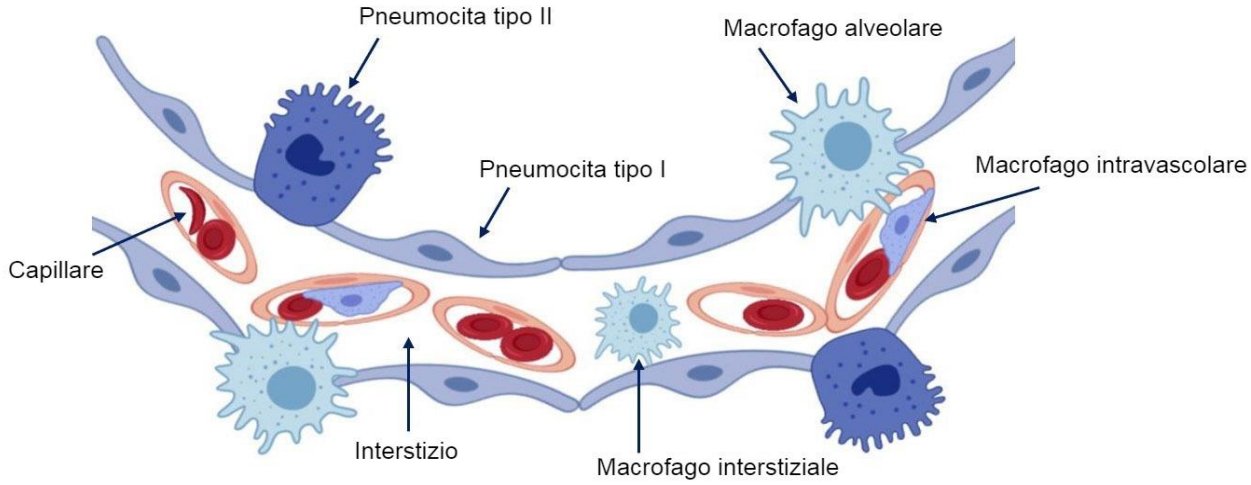


Figura 8: schema della parete della barriera alveolo-capillare polmonare

Il capillare che giunge nella zona di scambio di gas fra aria e sangue deriva dall'arteria polmonare. La sua parete, l'*endotelio capillare*, è formata da cellule microvascolari, che vanno a generare un monostrato continuo e privo di pori. È, quindi, una barriera semipermeabile, che va a regolare la permeabilità dei vasi sanguigni, l'angiogenesi, il tono vascolare[6] ed il passaggio di alcuni nutrienti dal sangue ai tessuti che ne hanno bisogno (Bhattacharya & Matthay, 2013; Tenenbaum-Katan et al., 2018). Nella zona in cui avviene lo scambio gassoso il capillare interagisce contemporaneamente con due alveoli (Barbatelli et al., 2018). La selettività della barriera emato-gassosa è determinata anche dalla presenza di *giunzioni strette* (*Tight* Junction, o TJ, come le claudine, occludine) e *giunzioni aderenti* (*Adherent* Junction, o AJ, come le Ve-Caderina, E-Caderina) (Bhattacharya & Matthay, 2013; Tenenbaum-Katan et al., 2018) fra le cellule. Pertanto, il trasporto paracellulare è notevolmente limitato, mentre il traporto di soluti avviene per lo più per via trans cellulare per diffusione passiva o attiva (ossia

[6] Tono vascolare: stato di contrazione della muscolatura dei vasi, che ne determina il diametro e regolando così il flusso locale. Nello specifico più il tono è contratto più il vaso sarà stretto e viceversa.

grazie all'azione di proteine trasportatrici che richiedono consumo di energia, sotto forma di ATP).

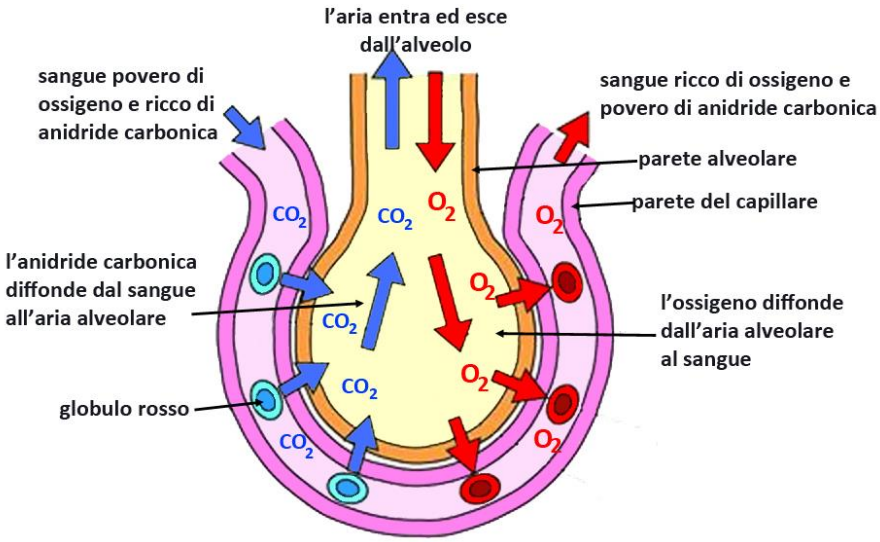


Figura 9: meccanismo d'interazione aria-barriera ematogassosa-sangue

1.1.2 PATOLOGIE DELLA BARRIERA ALVEOLO-CAPILLARE

La barriera alveolo capillare può essere esposta all'attacco di agenti patogeni e/o virali, o all'ingresso di particelle dannose per il nostro sistema respiratorio (Bhattacharya & Matthay, 2013; Kuehn et al., 2016).
Il primo meccanismo di difesa è il nostro sistema immunitario innato nei polmoni, che è rappresentato dai pattern-recognition receptors (PRR), i quali riconoscono particolari molecole presenti sulla superficie esterna degli agenti patogeni. Queste molecole sono anche dette pattern molecolari associate ai patogeni (PAMP), le quali quindi vengono riconosciute dal sistema immunitario, attivando i PRR ed innescando la reazione all'agente esterno.
I PRR più importanti sono:

- i recettori toll-like (TLRs): nell'uomo ne esistono dieci varianti. I TLRs sono proteine integrali di membrana dotate di due domini, uno extracellulare responsabile del riconoscimento di uno specifico PAMP ed uno intracellulare responsabile del

signaling e chiamato TIR (Toll-IL-1 Receptor). Più nello specifico, in seguito al riconoscimento del ligando si innesca una dimerizzazione ligando-dipendente TIR-PAMP, che porta i due domini TIR a stretto contatto, Ciò induce il reclutamento di *proteine adattatrici* [7]con il dominio TIR, che a loro volta attivano diverse *proteine chinasi*[8], che innescano diversi *fattori trascrizionali*[9] (Lorenzo Lucantonio, n.d.).

- **i recettori NOD-like (NLRs):** sono proteine citoplasmatiche che riconoscono peptidoglicani batterici, favorendo reazioni pro-infiammatorie. Nell'uomo ne esistono 20 tipologie. Si chiamano così perché si contraddistinguono per la presenza del dominio NOD (Dominio di oligomerizzazione e legante i nucleotidi) che lega i nucleotidi trifosfato (Lorenzo Lucantonio, n.d.).

- **i recettori RIG-I-like (RLRs):** sono sensori citosolici che riconoscono molecole di RNA a doppia elica e doppie catene eterologhe di RNA-DNA di origine virale. Nei polmoni, principalmente, si trova il RIG-1, che ha due domini N-terminali responsabili del reclutamento della caspasi ed altri due domini, una RNA-elicasi ed un C-terminale coinvolto nel riconoscimento dell'RNA (Lorenzo Lucantonio, n.d.).

- **i recettori della lectina C-type:** sono recettori del mannosio coinvolti nella fagocitosi. Nello specifico, questi recettori riconoscono e si legano a varie molecole di zuccheri (D-mannosio, L-fucosio, N-acetil-D-glucosammina) presenti sulle superfici dei batteri rendendo possibile la fagocitosi del microbo legato da parte dei macrofagi (Lorenzo Lucantonio, n.d.).

- **i recettori absence in melanoma 2-like (AIM2):** detta *proteina interferone inducibile* o *assente nel melanoma 2,* è una proteina che ci permette di difenderci da batteri o virus a DNA. Ha 343 residui amminoacidici con un dominio N-terminale ed uno C-terminale. Questa proteina riesce a riconoscere il DNA citoplasmatico (dsDNA) prodotto durante le infezioni virali e batteriche o dopo danni tissutali. I recettori AIM2 in seguito al riconoscimento di cellule danneggiate o di dsDNA favoriscono la produzione di citochine pro-infiammatorie conducendo a morte le cellule infettate o danneggiate prima che mutino in

[7] Proteine adattatrici: sono proteine prive di qualsiasi ruolo enzimatico, sono accessorie per le proteine principali, mediando però il legame fra diverse proteine mediando la formazione di complessi più grandi.
[8] Proteine chinasi: sono proteine enzimatiche, che catalizzano la fosforilazione di altre proteine.
[9] Fattori trascrizionali: sono proteine dotate di due domini, uno di legame del DNA (che può essere cis o trans) ed uno effettore, che svolge funzioni specifiche che regolano l'espressione genica.

neoplasiche. Inoltre, si pensa che l'AIM2 potrebbe agire da soppressore infiammatorio e tumorale ed un suo deficit potrebbe causare malattie auto-infiammatorie e tumori. È stato anche scoperto che l'AIM2 può interagire con altre proteine dell'immunità innata, regolando la risposta infiammatoria che precede i danni tissutali ad alto rischio di evoluzione neoplasica.

Oltre ai PRR fanno parte del sistema immunitario polmonare anche le *cellule dendritiche*, che fungono da sentinelle legandosi alle particelle inalate e sono responsabili del riconoscimento dei patogeni e della loro *presentazione* ad altre cellule immunitarie (Bhattacharya & Matthay, 2013; Nova et al., 2019).
Molto importanti sono anche gli pneumociti di Tipo 2, i quali producono del surfattante, che ha un importante ruolo nella difesa locale del sistema respiratorio (Bhattacharya & Matthay, 2013; Nova et al., 2019).

Gli pneumociti di Tipo I hanno invece uno strato citoplasmatico molto sottile e sono dotati di pochi mitocondri; ciò li rende molto sensibili al contatto con agenti esterni (Bhattacharya & Matthay, 2013).
Negli alveoli i nostri polmoni forniscono una difesa contro eventuali patogeni inalati mediante l'azione di due fluidi:

1) il liquido linfatico polmonare, che genera un condotto di comunicazione fra alveoli e linfonodi (Bhattacharya & Matthay, 2013);

2) l'alveolar wall liquid (AWL), che forma la sottofase di liquido acquoso per il layer protettivo di surfattante.

Entrambi i liquidi originano dalla filtrazione micro-vascolare (il flusso trans vascolare di acqua, proteine e piccoli soluti) (Bhattacharya & Matthay, 2013). E questo fluido filtrato scorre in parte nei capillari linfatici, formando la linfa, ed in parte attraverso la parete alveolare andando a formare l'AWL, anche se ad oggi il suo meccanismo di formazione non è ancora del tutto chiaro (Bhattacharya & Matthay, 2013).
Il nostro sistema respiratorio può essere colpito da diverse patologie più o meno gravi che possono creare grandi sofferenze all'individuo che ne viene colpito; e le due grandi famiglie delle patologie polmonari sono rappresentate dalle patologie polmonari acute (ALI) e dalle sindromi acute da distress polmonare (ARDS), che sono una manifestazione più aggressiva delle ALI (Matute-Bello et al., 2008). In

entrambi i casi si manifestano grave ipossiemia[13] e liquidi infiltrati (Matute-Bello et al., 2008). Più nello specifico i fenomeni che si verificano a livello polmonare con queste patologie posso essere divisi in diversi livelli (Matute-Bello et al., 2008):

- **Aspetti clinici**: si ha da subito un fenomeno di patologia acuta in cui si manifestano lesioni bilaterali alveolari diffuse e formazione rapida e abbondante di essudati, giungendo ad una riparazione dei danni con tessuto fibrotico (Matute-Bello et al., 2008).

- **Cambiamenti fisiologici**: si altera il rapporto ventilazione/perfusione (V/Q)[10], la cui conseguenza è una severa ipossiemia[11], ridotta compliance e compromissione della clearance del fluido alveolare (Matute-Bello et al., 2008).

- **Cambiamenti biologici**: aumentano le permeabilità epiteliali ed endoteliali e si ha una forte reazione infiammatoria dovuta all'aumento di citochine e all'attivazione delle proteasi, cui si aggiungono coaguli anomali (Matute-Bello et al., 2008).

- **Cambiamenti patologici**: i neutrofili s'infiltrano negli alveoli, in cui inoltre si hanno coagulazione e deposizione di fibrina, con successiva degradazione dell'epitelio alveolare che lascia scoperta la membrana basale (Matute-Bello et al., 2008).

Alle famiglie delle ALI e delle ARDS appartengono diverse patologie, fra le quali (Barbatelli et al., 2018):

- **Fibrosa cistica**: una malattia genetica che affligge vari organi e che porta alla progressiva perdita delle funzioni polmonari a causa di un'eccessiva produzione di muco molto denso che va ad occludere le vie respiratorie più piccole (Barbatelli et al., 2018).

- **Insufficienza polmonare**: è una patologia che porta al collasso degli alveoli impedendo un corretto scambio gassoso. La causa è stata individuata in infezioni

[10] Rapporto V/Q: è un indice della concentrazione di ossigeno nel sangue, che esce dal circolo polmonare e raggiunge i tessuti e gli organi del nostro corpo.

[11] Ipossiemia: condizione nella quale la pressione parziale di ossigeno nel sangue (in particolare quello arterioso) si abbassa notevolmente.

polmonari o eventuali lesioni che generano una sovrapproduzione di surfattante, ma più spesso è causata da insufficienza cardiaca (Barbatelli et al., 2018).

- **Edema polmonare**: è una malattia che insorge quando si accumula liquido nei polmoni, che va ad ostacolare lo scambio gassoso (Barbatelli et al., 2018). Le cause possono essere di diversa origine (cardiache, ipertensione, renali, infezioni polmonari, fumo o effetto collaterale di farmaci) (Barbatelli et al., 2018). In quella cardiogenica si ha una forte congestione polmonare con conseguente aumento della pressione capillare (Barbatelli et al., 2018). L'alta pressione conduce alla distruzione della barriera ematogassosa con successiva perfusione di liquido all'interno degli alveoli, nei quali si registra una iperproduzione di surfattante ed aumento della sua tensione superficiale (Barbatelli et al., 2018; *Cardiogenic Pulmonary Edema - PubMed*, n.d.). Inoltre, l'iper-filtrazione attraverso le pareti del letto vascolare crea un edema ricco di proteine nell'interstizio e nello spazio aereo dei polmoni, anche se la pressione polmonare resta normale (Bhattacharya & Matthay, 2013).

- **Embolia polmonare:** è un fenomeno in cui si genera un'ostruzione di uno o più rami dell'arteria polmonare. Spesso questa è causata da un embolo o trombo che parte da una vena degli arti inferiori (Barbatelli et al., 2018).

- **Polmonite**: è dovuta ad un'infezione batterica o virale e porta all'infiammazione del parenchima polmonare. Dal punto di vista epidemiologico si divide in *nocosomiale (*contratta in ospedale) oppure *comunitaria* (contratta al di fuori dell'ospedale) (Barbatelli et al., 2018).

- **Broncopneumatia cronica ostruttiva (BPCO):** causa la riduzione di introduzione di aria nei polmoni portando gravi sofferenze per il paziente. Le cause sono moltissime fra queste l'*asma* che porta a edema della mucosa, contrazione della muscolatura liscia ed aumento della secrezione di muco (Barbatelli et al., 2018). Oppure la *bronchite* che infiamma la mucosa delle vie respiratorie con successiva iperproduzione di muco (Barbatelli et al., 2018). Un'altra causa è l'*enfisema* che rende le pareti alveolari poco elastiche e dilatate, che andranno quindi a comprimere i capillari circostanti (Barbatelli et al., 2018). Oltre a queste ci possono essere cause ambientali (fumo, inquinamento, esposizione ad egenti chimici), malattie infettive, povertà, malnutrizione, fattori genetici, e in tutti i casi,

comunque, si arriva ad un'infiammazione cronica delle vie aree che ostacola la respirazione (Barbatelli et al., 2018).

- **Tumore polmonare**: è il terzo tumore più diffuso dopo quello al seno e quello alla prostata (Petersen, 2011). La causa principale è il fumo di sigarette oppure il fumo passivo, poi ci possono essere cause ambientali, genetiche, l'esposizione ad agenti chimici o radiativi negli ambienti di lavoro (nickel, cromo, arsenico), oppure il contatto con l'amianto (Barbatelli et al., 2018). La World Health Organization (WHO) classifica il cancro polmonare in (Petersen, 2011):

- **Carcinoma delle cellule squamose**: caratterizzato da cheratinizzazione e formazione di ponti intercellulari (Petersen, 2011).

- **Adenocarcinoma**: in genere si presenta con una crescita anomala di ghiandole o acini, con differenziazione papillare, o si potrebbe presentare come uno strato spesso quanto un foglio di carta lungo il setto alveolare e bronchioli, in quest'ultimo caso si parla di *carcinoma* bronchioalveolare (Petersen, 2011).

- **Carcinoma delle cellule larghe**: è una forma tumorale che genera cellule poco differenziate e non di piccole dimensioni con diagnosi sfavorevole, ma le loro caratteristiche sono diverse dalle cellule squamose e da quelle dell'adenocarcinoma (Petersen, 2011).

- **Carcinoma delle cellule piccole**: è caratterizzato dalla formazione di cellule ad alta attività proliferativa e di piccola dimensione, inoltre sono cellule poco differenziate ed anche in questo caso è a prognosi sfavorevole (Petersen, 2011).

Tuttavia, al di là della classificazione, il tumore polmonare tende a presentarsi in forme miste come il carcinoma adenosquamoso oppure il carcinoma delle cellule piccole combinato, che ha cellule di proporzione maggiore rispetto a quelle delle cellule coinvolte nella forma classica; inoltre, l'adenocarcina si presenta spesso come una forma mista di quelle su dette (Petersen, 2011). La diversità e

l'eterogenicità del tumore polmonare generano grosse difficoltà diagnostiche, a cui si aggiunge la capacità di mutare da un fenotipo all'altro generando un'instabilità genetica che rende il tumore polmonare letale (Petersen, 2011).
Il tumore polmonare si potrebbe presentare sia in forme maligne che benigne, ma data la capacità di mutazione di cui sono dotate le cellule tumorali si passa, a volte, da una forma all'altra (*Ciliated Muconodular Papillary Tumor of the Lung: A Case Report and Literature Review - PubMed*, n.d.). Un esempio è il carcinoma polmonare con cellule ciliate che in genere è benigno e colpisce la zona centrale del polmone. Tuttavia, è stata individuata una forma maligna di basso grado, il tumore muconodulare papillare ciliato (CMPT). Questa tipologia di tumore colpisce il polmone a livello periferico ed è caratterizzato da cellule ciliate e cellule caliciformi e con proliferazione delle cellule basaloidi; le caratteristiche di questo tumore sono ancora poco note, tanto è vero che neanche la WHO lo ha classificato (*Ciliated Muconodular Papillary Tumor of the Lung: A Case Report and Literature Review - PubMed*, n.d.).

Per quanto riguarda i meccanismi di riparazione del polmone, questi sono governati da fenomeni di trasporto calcio dipendenti e dall'azione di cellule progenitrici (Bhattacharya & Matthay, 2013). Infatti, è stato visto che le cellule ATII sono in grado di formare nuove ATI ed ATII ripopolando l'alveolo danneggiato (Bhattacharya & Matthay, 2013). Mentre quest'ultima capacità di guarigione è limitata ai polmoni adulti (Rajzer et al., 2014), recentemente è stato anche visto che nelle fasi neonatali dell'individuo le cellule ATI mostrano un'elevata plasticità (Rajzer et al., 2014). Nello specifico esse garantiscono il corretto sviluppo del polmone in fase neonatale e nel caso in cui insorgesse una patologia polmonare acuta in fase di sviluppo le ATI sono in grado di riprogrammarsi in ATII consentendo così la rigenerazione alveolare (Rajzer et al., 2014). Sono state individuate nei topi nicchie con cellule progenitrici che potrebbero contribuire alla riparazione polmonare, mentre quelle umane devono ancora essere identificate (Bhattacharya & Matthay, 2013).

1.2 DALLA MEDICINA TRADIZIONALE ALLA MEDICINA DI PRECISIONE

Ad oggi, la medicina tradizionale ha difronte ancora molte sfide contro, ad esempio, patologie ancora poco note, sia nel loro sviluppo che nel modo di trattarle o prevenirle. Tuttavia, spesso la difficoltà nel contrastare una patologia risiede anche nel metodo adottato per trattarla, infatti diversi sono i casi in cui una determinata terapia funziona bene per un paziente ma non è efficacie su di un altro. La soluzione a questo problema la si sta cercando di trovare mettendo a punto gli strumenti di diagnosi e prognosi che potrebbe offrire la Medicina di Precisione (PM).
La PM si basa su dati puramente genetici che raccoglie da una popolazione di individui e che elabora sfruttando i più potenti mezzi di Intelligenza Artificiale (Machine Learning, Deep Learning) (König et al., 2017). Grazie a questa nuova arma, nella ricerca si parte da un gruppo più ampio di dati su di una popolazione di pazienti, e grazie ad un'analisi ciclica di questi dati si fa una vera e propria stratificazione della popolazione di pazienti, arrivando poi a personalizzare i trattamenti per ogni individuo con determinate caratteristiche (König et al., 2017). Per cercare di aprire la PM alle necessità della salute pubblica sono stati presi dati di natura genetica, ambientali e legati allo stile di vita, allo scopo di includere caratteristiche condivise da un'intera comunità. Nel lavoro di König IR et al (König et al., 2017) infatti, la PM viene definita come una strategia di sviluppo di nuove terapie basate su dati:

- Genetici.
- Fenotipici e fisiologici.
- Legati allo stile di vita.
- Derivanti dalla storia clinica.

Questo insieme di dati infatti soddisfa e va in contro ad una problematica affrontata anche nello studio di Ramania et al. (Ramaswami et al., 2018), dove è stato evidenziato come uno dei due grandi limiti della PM è di riferirsi solo ad una minima parte della popolazione, adottando solo l'analisi di dati di tipo genetico, e quindi ciò presentava un notevole divario fra PM e Medicina tradizionale. Il secondo problema, che è emerso da questo studio, si riferisce al fatto che i metodi di prevenzione e/o trattamento si fondano su un'indagine prettamente genetica e questo fatto, affiancato all'approccio della PM, potrebbe minacciare l'incolumità dei pazienti se i test effettuati non dovessero essere del tutto verificati (König et al., 2017; Ramaswami et al., 2018). Quindi, nonostante l'intervento dell'ex presidente USA Barak Obama allo State of the Union Adress del 2015, in cui annunciò la fiducia nella sperimentazione

della PM, ad oggi (sette anni dopo) si è giunti al punto in cui si richiedono dati validi e robusti a sostegno della PM, affinché si assicurino efficacia e sicurezza per la popolazione nell'applicare una terapia od una tecnica di prevenzione (Ramaswami et al., 2018). Inoltre, per questo si devono educare i medici alla corretta interpretazione e a dare un certo peso e fiducia ai dati che emergono dai test genetici (König et al., 2017; Ramaswami et al., 2018).

1.3 ORGANIZZAZIONE DI PRECLINICAL E CLINICAL TRIALS

La ricerca è sempre stato lo strumento più potente contro numerose malattie ignote; infatti, ci ha permesso di sviluppare dei trattamenti nuovi ed alternativi contro varie patologie.
La ricerca si organizza in due fasi, che sono il preclinical trial, in cui si svolgono studi su cellule e animali, e clinical trial in cui si passa allo studio in umano. Le due fasi si organizzano seguendo diversi step ben precisi:

1) *modelli in vivo*: in cui si utilizzano cavie animali per effettuare test sistemici o di studio di risposta globale ad uno stimolo esterno.

2) *modelli in vitro*: vengono utilizzati uno o più tipi di cellule animali o umane per effettuare test mirati.

3) Clinical Trials: è l'indagine svolta in umano, che a sua volta si divide in altre quattro sottofasi in cui pian piano si allarga il gruppo d'indagine.

1.3.1 MODELLI in vivo

Lo studio su modelli animali è stato ed è il punto di partenza della ricerca in quanto permette di fare studi su organismi complessi in un bioambiente vivo e dinamico. Tuttavia, negli anni sono stati evidenziati numerosi problemi etici nell'utilizzo degli animali, perché spesso, in termini di sofferenza e di numero di cavie sacrificate, il mantenimento di tali metodi di ricerca è divenuto insostenibile. Inoltre, date le differenze biologiche fisiologiche fra esseri umani ed animali, l'utilizzo di questi modelli si è rivelato limitante in termini di predittività sperimentale.

Ad oggi, l'utilizzo delle cavie animali è regolamentato da delle leggi ben precise, le quali danno una linea guida alla scelta del modello animale in funzione dello studio che si sta facendo. In particolare, i modelli animali scelti sono quelli in cui le differenze genetiche con l'uomo siano molto basse. Per quanto riguarda le ALI e le ARDS dato che le differenze cliniche dei pazienti patologici sono molto diverse da paziente a paziente i modelli animali hanno aiutato molto a capire alcuni fenomeni alla base di queste patologie (Matute-Bello et al., 2008).
I modelli per eccellenza sono quelli murini, i quali infatti, a livello del DNA, possiedono il 90% delle regioni codificanti per le proteine identiche agli esseri umani, così come il 98% di omologhi ortologici Ad esempio, nei polmoni umani è presente l'interluichina-8 (CXCL8)[12] che, invece, nei topi è assente ma viene sostituita da un omologo che è rappresentano da due chemochine, la KP e la MIP-2, la cui funzione è praticamente identica (Matute-Bello et al., 2008).
Tuttavia, ci sono vari aspetti che vengono considerati nella scelta di un modello animale per patologie polmonari, uno è la specificità dei recettori Toll-like, che hanno evidenziato delle differenze fra modelli murini e modello umano che non renderebbero del tutto predittivi gli studi *in vivo* (Matute-Bello et al., 2008). Altri aspetti che vengono analizzati nel selezionare un modello animale per la riproduzione di patologie polmonari sono la presenza di macrofagi polmonari intravascolari (PIM), che nell'uomo non sono presenti e la loro presenza indica una grande predisposizione per le patologie del sistema respiratorio (Matute-Bello et al., 2008). Inoltre, si osserva anche la suscettibilità all'ossido nitrico (NO) coinvolto in diverse patologie polmonari, e a cui la sensibilità di ogni organismo è dose dipendente e cambia da specie a specie (Matute-Bello et al., 2008). Inoltre, vanno anche considerate le dimensioni, che più sono ridotte più i tempi di studio si accorciano e la facilità di manipolazione genetica e considerando tutti questi aspetti i modelli murini risultano essere i migliori (Matute-Bello et al., 2008).
Le questioni etiche riscontrate nell'applicazione degli animali nella ricerca hanno comunque spinto allo sviluppo di modelli alternativi basati sull'utilizzo di cellule umane (come ad esempio organoidi, sistemi microfluidici e modelli in vitro che sfruttano principi del *Tissue Engineering*) volti a migliorare la predittività degli studi preclinici ed evitare effetti avversi nella fase di Clinical Trial.
I modelli fino ad ora sviluppati non sono ancora stati accettati nel regolatorio per lo sviluppo di terapie e per questo si cerca di seguire la teoria delle 3R's, un concetto concepito nel 1959 da W.M.S. Russel ed M. Burch (Russell & Burch, 1959). Più nello specifico la sigla 3Rs intende i seguenti punti:

[12] CXCL8: chemochina fondamentale nel reclutamento dei neutrofili in risposta a prodotti batterici.

1) **Replacement** ("sostituzione"): si intende il processo tramite il quale si accelera verso la sostituzione dei modelli animali con le alterative *in vitro* ed *in silico* basate su l'utilizzo di una parte biologica umana e non animale (Russell & Burch, 1959).

2) **Reduction** ("riduzione"): riferito alla riduzione del numero di animali nella fase di preclinical trial mediante l'utilizzo di procedure e step sperimentali che minimizzino il sacrificio degli animali e quindi il numero di animali necessari per gli esperimenti (Russell & Burch, 1959).

3) **Refinement** ("migliorare le condizioni di vita"): come dice la stessa parola si intende appunto cercare di creare degli ambienti confortevoli e più familiari per gli animali che vengono utilizzati, avere dei medici-veterinari che controllino il loro status di salute e ridurre le loro sofferenze mediante l'adozione del cosiddetto **human-end-point**[13] (Russell & Burch, 1959).

Tutti e tre i punti su detti hanno in comune un elemento chiave per la ricerca, che è rappresentato dalla condivisione dei dati fra i vari gruppi. Questo aspetto va incontro a tutti e tre i principi in quanto consente di conoscere informazioni su come sono stati condotti certi esperimenti e soprattutto, risultati alla mano, non doverne ripetere altri che potrebbero non essere necessari, dal momento che gli esiti di questi studi potrebbero già essere stati ottenuti in un'indagine precedente da altri.
Inoltre, è centrale anche lo stabilire dei protocolli chiari di studio, all'interno dei quali si minimizzino le sofferenze degli animali, le procedure di analisi non richiedano il sacrificio della cavia ed allo stesso tempo però sia mantenuta la validità statistica dello studio (Russell & Burch, 1959; Waugh CA, 2022).
Tuttavia, l'obiettivo reale è quello di sostituire del tutto gli animali nel preclinical trial, ma si è ancora lontani perché i modelli alternativi sono ancora poco diffusi e ancora non del tutto consolidati (Waugh CA, 2022). Per questo si sta cercando di passare dalle 3R alle 5R, aggiungendo (Waugh CA, 2022):

[13] Human-end-point: è uno step in fase di trial preclinico in animale, durante il quale si osserva che lo status vitale e di sofferenza dell'animale son tali da non poter più proseguire e si decide di sacrificare la cavia.

4) **Robustness** ("robustezza") o **Rigour** ("rigore"): con cui si cerca di adottare modelli sperimentali più robusti ed imparziali (Waugh CA, 2022).

5) **Reproducibily** ("riproducibilità"): questo quinto punto deriva direttamente dal precedente che porta ad una maggiore trasparenza nel condividere metodi e risultati e quindi ad una maggiore riproducibilità e trasparenza nel metodo della ricerca (Waugh CA, 2022).

1.3.2 Modelli *in-vitro*

Le colture cellulari rappresentano la primissima fase del trial preclinico e si svolgono seguendo protocolli ben precisi in cui si possono scegliere diverse fonti cellulari:

- **Cellule primarie differenziate**: sono una fonte molto potente in quanto sono cellule già mature, ma ci sono problemi di reperibilità in quanto essa dipende dall'età del paziente (più il paziente è anziano meno cellule saranno disponibili), inoltre *in vitro* tendono a perdere il fenotipo[14] e la loro capacità proliferativa è limitata (Sara Mantero et al., 2022).

- **Cellule di linea**: sono cellule immortalizzate mediante agenti chimici o virali. Queste cellule hanno un alto potenziale nella ricerca perché sono facilmente reperibili presso le "banche cellulari" ed hanno un potenziale proliferativo infinito (Sara Mantero et al., 2022). Il loro comportamento in coltura è ben noto ed hanno un fenotipo stabile, e tutto questo da alta riproducibilità ed affidabilità agli esperimenti (Sara Mantero et al., 2022). Il problema risiede nel fatto che la loro natura non le rende molto predittive di quello che potrebbe succedere in umano, né tanto meno le rende impiantabili *in vivo* sia in umano che sugli animali in quanto tendono a formare teratomi[15] (Sara Mantero et al., 2022), in quanto cellule modificate.

---

[14] Fenotipo: fenotipo è quello che descrive le caratteristiche di un organismo vivente, in termini di proprietà biochimiche, morfologiche e fisiologiche. Spesso il fenotipo è associato al genotipo, che invece indica tutta l'informazione genetica, di cui parte viene espressa tramite il fenotipo.

[15] Teratomi: sono masse tumorali che si formano, in genere, a livello dei tessiti embrionali; con origine dalle cellule della linea germinale.

- **Cellule staminali**: le cellule staminali hanno un potenziale proliferativo funzione della loro staminalità, che ci permette di classificarle, andando in ordine decrescente di potere di differenziazione, in totipotenti (si differenziano in tutti i fenotipi cellulari), pluripotenti o multipotenti (si differenziano in tutti i fenotipi dei tre foglietti germinali) e unipotenti (si differenziano in un solo fenotipo) (Sara Mantero et al., 2022). La staminalità viene persa da queste cellule nel tempo in quanto a seguito di diversi fattori (come gli stimoli del microambiente in cui si trovano, segnali provenienti da altre cellule, apoptosi) vanno a specializzarsi sempre di più verso un determinato fenotipo (Sara Mantero et al., 2022). Tuttavia, la loro origine ed il loro utilizzo hanno sollevato numerose questioni etiche che meritano un discorso completamente separato dallo scopo di questo elaborato di tesi. Nella ricerca, si è cercato si superare questo ostacolo con la scoperta e lo sviluppo delle cellule staminali pluripotenti indotte (iPSCs). Queste sono cellule somatiche umane, riprogrammate a staminali pluripotenti ed hanno un ottimo potenziale, in quanto offrono la possibilità di condurre studi per nuove terapie (Sara Mantero et al., 2022; Yoshihara et al., 2019). Tuttavia, l'utilizzo delle iPSCs è frenato dalla loro instabilità fenotipica a causa della tecnica con cui vengono prodotte oppure magari perché le cellule originarie si portavano già dietro un'alterazione genetica che le rendeva instabili (Yoshihara et al., 2019).

Le cellule, essendo isolate, non posso essere tratta esposte all'aria, ma si devono maneggiare solo ed esclusivamente in ambiente sterile per evitare di contaminarle e quindi inducendone la morte. Infatti, nei laboratori cellulari si lavora sempre seguendo le norme Good Laboratory Practice (GLP) le colture cellulari vengono svolte sempre e solo in ambienti sterili, ossia, lavorando in laboratorio, sotto cappa a flusso laminare. In questo modo si riesce a lavorare in un ambiente sterile, all'interno del quale si opera solo ed esclusivamente con strumenti precedentemente sterilizzati(Sara Mantero et al., 2022).
Le tecniche di coltura cellulare che si possono adottare sono diverse:

- **Colture in sospensione**: sono colture che vengono fatte in agitazione con aggregati di cellule, o cellule singole, che non richiedono adesione (Sara Mantero et al., 2022). Le cellule vengono coltivate con lo scopo di aumentare il loro numero. Il problema principale di questo metodo risiede nella distribuzione dei nutrienti che non arrivano a tutte le cellule man mano che gli aggregati crescono; infatti, la diffusione delle molecole è più difficile all'aumentare dello spessore e in particolare a quelle più interne arriverà meno ossigeno (Sara Mantero et al., 2022). Inoltre, la visualizzazione delle cellule in agglomerati è molto difficile (Sara Mantero et al., 2022).

- **Colture di linea**: si eseguono utilizzando cellule di linea. La loro applicazione però è ristretta all'indagine di laboratorio, in quanto, qualora venissero impiantate *in vivo* sia in umano che in un tessuto animale indurrebbero la formazione di tumori (Sara Mantero et al., 2022). I loro vantaggi risiedono nella possibilità di acquistarle nelle "Banche Cellulari", nell'avere un fenotipo stabile, i loro metodi di trattamento sono noti e quindi gli esperimenti sono ripetibili e riproducibili (Sara Mantero et al., 2022).

- **Coltura primaria**: come suggerisce il nome, la fonte cellulare sono le cellule differenziate adulte (o primarie come su detto), prelevate dal tessuto di un paziente (Sara Mantero et al., 2022). Le cellule vengono ricavate a seguito di una biopsia del tessuto che viene poi sottoposto al trattamento di degradazione della matrice extracellulare (ECM) attraverso opportuni enzimi degradativi (Sara Mantero et al., 2022). In seguito, si isolano le cellule d'interesse, che verranno poi messe in coltura. Il problema con queste cellule è che la loro potenza proliferativa dipende dall'età del soggetto da cui vengono prelevate, inoltre essendo estratte da tessuto non è detto che la popolazione cellulare sia pura al 100%; inoltre il metodo di isolamento dal tessuto può danneggiare le cellule stesse se non stoppato al momento opportuno (Sara Mantero et al., 2022). In fine, c'è il rischio che le cellule primarie tendano a de-differenziare e assumere un fenotipo di fibroblasti (Sara Mantero et al., 2022).

- **Coltura su monostrato**: definita anche coltura aderente o ancoraggio dipendente. Le cellule che vengono coltivate sono appunto ancoraggio dipendenti e vengono portate ad un'elevata densità (Sara Mantero et al., 2022). Prima della coltura si tratta il terreno affinché venga caricato in maniera tale da favorire le interazioni cellula-cellula (Sara Mantero et al., 2022). La crescita cellulare viene fatta proseguire fino a che non viene fermata con un processo definito come inibizione del contatto, che viene eseguito o per via enzimatica o meccanica (Sara Mantero et al., 2022). La visualizzazione delle cellule è molto semplice (Sara Mantero et al., 2022). Tuttavia, sono richiesti molti terreni per raggiungere numeri elevati di cellule in quanto le dimensioni del terreno pongono un limite fisico alla crescita cellulare (Sara Mantero et al., 2022).

- **Coltura tridimensionale:** è una tecnica di coltura all'interno della quale si cerca di avere un ambiente tridimensionale affinché le cellule abbiano la possibilità di

formare costrutti più complessi organizzandosi su più strati, grazie ad interazioni intercellulari (Yuan et al., 2018). In questo modo si riproduce in maniera più biomimetica le caratteristiche del bioambiente cellulare *in vivo* (Yuan et al., 2018).

Questi ultimi due tipi di coltura cellulare verranno analizzati nel dettaglio nei paragrafi successivi.
Le colture vengono sempre eseguite in supporti opportuni realizzati solitamente in polistirene, una plastica trasparente, che facilita anche l'osservazione al microscopio e l'indagine visiva della coltura, alle volte opportunamente trattata per la coltura cellulare (Sara Mantero et al., 2022). In base al tipo di coltura si possono utilizzare semplici piaste di Petri, fiasche o piaste multipozzetto (Sara Mantero et al., 2022). Un elemento chiave della coltura cellulare è il mezzo di coltura, con il quale si vanno a pretrattare i terreni prima della coltura, affinché essi assorbano le proteine necessarie all'adesione cellulare (laminina e fibronectina) (Sara Mantero et al., 2022). In più, il mezzo di coltura è molto importante in quanto deve contenere tutti i nutrienti necessari al mantenimento delle cellule in coltura ed evitare la loro morte; per questo in base al tipo di coltura il mezzo viene spesso sostituito per mantenerlo sempre fresco e ricco di nutrienti (Sara Mantero et al., 2022).
L'ambiente di coltura deve inoltre sempre essere monitorato in termini di:

- **Temperatura**: deve essere sempre attorno ai 37°C ed evitare che salga sopra i 43°C perché le cellule, *in vitro*, non resistono all'ipertermia, oppure non possono essere mantenute per troppo tempo a temperature troppo basse per evitare l'arresto delle funzioni cellulari e, quindi, la loro morte (Sara Mantero et al., 2022).

- **Livelli di umidità**: deve essere sempre al 95%, per evitare l'evaporazione del mezzo di coltura, in quanto andrebbe ad alterare la concentrazione dei componenti nel mezzo (Sara Mantero et al., 2022). Per combattere questo fenomeno oltre al controllo sull'umidità si pongono in incubatore anche delle piastre piene di acqua (Sara Mantero et al., 2022).

- **pH**: è un parametro che deve essere monitorato frequentemente in quanto lo si deve sempre tenero intorno al valore fisiologico di 7,4 (Sara Mantero et al., 2022). Infatti, le cellule con la loro normale attività metabolica tendono ad acidificare l'ambiente (Sara Mantero et al., 2022). Per bilanciare questo fenomeno, in genere si applica un sistema tampone bicarbonato/acido carbonico che va a neutralizzare la concentrazione degli ioni H^+ (Sara Mantero et al., 2022). La

funzionalità del tampone viene garantita dalla presenza di un'alta concentrazione di CO2 gassosa (circa 5%) nell'ambiente incubatore. Oltre al sistema tampone, il controllo sul pH viene eseguito anche grazie ad un feedback visivo che si ottiene con l'aggiunta di un indicatore colorimetrico, solitamente rosso fenolo, al mezzo di coltura (Sara Mantero et al., 2022). Nello specifico quando il mezzo in coltura vira verso una tonalità rosso scuro il pH della soluzione è sbilanciato verso l'acido, e ciò ci dice che le cellule hanno consumato tutti i nutrienti, se invece il mezzo tende ad assumere un colore viola, si ha un pH basico e questo è un indice di una sofferenza cellulare. In entrambi i casi si procede con la sostituzione del mezzo di coltura con mezzo fresco.

1.3.2.1 COLTURE CELLULARI 2D

Le colture cellulari bidimensionali sono stati i primi metodi di studio di ricerca basati sull'utilizzo delle cellule. Queste tecniche sono eseguite in genere su monostrato sfruttando diverse fonti cellulari (Sara Mantero et al., 2022). Le tecniche di coltura 2D sono metodi solitamente semplici da applicare, inoltre poco costosi e ad alta riproducibilità e ripetibilità (Sara Mantero et al., 2022). Nello studio di Dhruva K. Mishra et al. (Mishra et al., 2012) sono state confrontate una coltura 2D ed una coltura 3D nella riproduzione di un modello tumorale di polmone. Nello specifico per la coltura 2D sono state utilizzate cellule di linea A549 (cellule derivate da adenocarcinoma basale alveolare). Per il modello 3D invece, è stato realizzato un costrutto composto da polmoni e trachea murini decellularizzati, e sono stati posti in un bioreattore (Mishra et al., 2012). Come si evince da questo esempio, le colture cellulari 2D sono più rapide e si rischia di commettere meno errori nella loro preparazione. Tuttavia, dai risultati che gli autori hanno ottenuto, è stato visto che la predittività di un modello 2D è scarsa; infatti, il tasso di mortalità cellulare e di metalloproteasi nel modello tridimensionale era molto più alti, e ciò lo rende un modello altamente più simile al bioambiente tumorale di polmone *in vivo,* e quindi più utile per eventuali studi di nuove terapie. Un ulteriore esempio è stato lo studio svolto da Amal Essaouiba et al. (Essaouiba et al., 2021), in cui, a partire da cellule staminali pluripotenti indotte umane (hiPSCs) sono stati realizzati due modelli di cellule β-pancreatiche umane per la ricerca sul diabete. Le cellule sono state coltivate sia in 2D, su delle piastre Petri (seguendo un protocollo standard ben consolidato per queste cellule), che in 3D (organoidi), in entrambi i casi in coltura statica. Poi, i costrutti

sono stati inseriti all'interno di un biochip microfluidico. Dallo studio è emerso che i costrutti tridimensionali presentavano marker β e α specifici delle cellule pancreatiche, con i secondi a livelli più alti dello standard 2D, e con buona risposta a livelli bassi e alti di insulina sia in statico che in dinamico, mantenendo questo comportamento per un lungo periodo. Invece, le cellule coltivate in 2D, pur sviluppando dei marker tipici delle cellule pancreatiche, quando sono state inserite nel biochip hanno fallito nella formazione di isole pancreatiche funzionali.
A discapito dei vantaggi in termini di set up e ripetibilità del test, le colture 2D presentano molti limiti, dovuti principalmente al fatto che un ambiente a due dimensioni è scarsamente biomimetico; inoltre, l'assenza degli opportuni stimoli chimico-fisici rende gli studi poco predittivi di quello che potrebbe accadere *in vivo* (Bhowmick et al., 2018; Mittal et al., 2019).
In più, non è semplice controllare la forma delle cellule, che è un indice importante dello status della loro salute e che in 2D tende ad essere piatto in quanto le cellule si adattano alla superficie della piastra di coltura (Jensen & Teng, 2020).
Le differenze tra coltura cellulare bidimensionale e tridimensionale sono notevoli e per le loro differenze ci si è mossi sempre di più verso modelli di coltura tridimensionali (Jensen & Teng, 2020).
Brevemente, la coltura 2D permette di fare studi ripetibili, a basso costo ed in tempi ridotti; tuttavia, la capacità di riprodurre il bioambiente reale è notevolmente più bassa rispetto al caso tridimensionale (Jensen & Teng, 2020). Infatti, le colture 3D permettono di avere dei costrutti in cui le cellule hanno una morfologia similare a quella *in vivo,* inoltre il crosstalk fra i vari fenotipi permette di avere una risposta a determinati stimoli più veritiera. Ad esempio, le cellule 2D tendono ad avere un tasso di mortalità più alto rispetto a quelle in 3D, che risultano essere più resistenti (Essaouiba et al., 2021; Jensen & Teng, 2020). Alcuni problemi si hanno però in termini di costi e tempi di coltura, che sono più alti, in quanto ad esempio i volumi di mezzo e dei supporti di coltura in gioco sono maggiori, così come il numero di cellule necessarie (Jensen & Teng, 2020).
Un tentativo di superamento di queste limitazioni è stato quello di introdurre nuovi supporti alla coltura cellulare, come isolette adesive, micro-pozzetti, micropillars (METI REF). Questi sistemi però, si basano sulla formazione di una polarità fra zona apicale e basale che è innaturale e potrebbe alterare i risultati degli studi (Duval et al., 2017; LeCluyse et al., 1994).
Per cercare di incrementare l'efficacia di questi metodi di coltura si è cercato di introdurre nuovi metodi, come la coltura a sandwich, che ha permesso di attuare

colture complesse, come una coltura in 2D degli epatociti, che non riuscivano a sopravvivere sotto i tradizionali metodi di coltura.
Il metodo a sandwich consiste nel seminare le cellule fra due superfici polimeriche, in genere di collagene (Duval et al., 2017; LeCluyse et al., 1994). Nel caso della coltura di epatociti è stato visto che questi riuscivano a sviluppare una rete ottimale di canali biliari (Duval et al., 2017; LeCluyse et al., 1994). Inoltre, questo tipo di colture si stanno impiegando anche in ambito polmonare, dal momento che hanno un'ottima capacità di favorire le adesioni delle proteine di membrana (i.e. integrine) e di mimare il gradiente di rigidezza di alcune tipologie di membrana, come ad esempio quella del polmone nel caso dell'ipertrofia polmonare idiopatica (IPF) (Kaplan DL, 2022). Tuttavia, essendo modelli molto recenti, in letteratura gli studi che utilizzano queste tecniche sono pochi o addirittura assenti in ambito polmonare (Kaplan DL, 2022).
Tuttavia, i metodi di coltura 3D sono comunque più vantaggiosi in termini di predittività di ciò che potrebbe accadere *in vivo* come dimostrato anche nello studio di Rudra Bhowmick et al. (Bhowmick et al., 2018). In questo studio, si sono sviluppati due modelli aria-liquido di polmone affetti dal virus Influenza A, un modello 2D ed uno 3D, realizzati utilizzando cellule epiteliali delle piccole vie aeree umane (HSAEpCs), e come supporto di coltura 3D uno scaffold di chitosano e collagene. Dallo studio è emerso che il modello 3D presentava una maggior fedeltà con al modello di epitelio delle vie aeree inferiori, con una maggiore vitalità delle cellule e con espressione di acquaporine-5 e citocheratina-14 tipiche di questo costrutto (Bhowmick et al., 2018). Inoltre, anche la risposta all'infezione da virus ha permesso di replicare più verosimilmente quello che accade *in vivo* (Bhowmick et al., 2018).

1.3.2.2 METODO DI COLTURA IN TRANSWELL®

Le Transwell® sono degli inserti di coltura in cui è possibile fare una co-coltura di cellule sia ancoraggio-dipendenti che ancoraggio-indipendenti. Più nello specifico le Transwell® sono dotate di un inserto per una membrana porosa, sopra e sotto la quale è possibile coltivare delle cellule potendo riprodurre un'interfaccia liquido-liquido o aria-liquido (*Transwell® Permeable Supports | Guidelines for Use | Corning*, n.d.).

Grazie alla loro struttura, inoltre, le Transwell® consentono di coltivare due fenotipi cellulari a cavallo della membrana porosa (Lu et al., 2019) conferendo maggiore biomimeticità alle colture *in vitro* svolte con questa tecnica. Le Transwell® vengono spesso indicate come colture 2.5D (Kaplan DL, 2022) per la possibilità che forniscono questi supporti di coltura di ricreare *in vitro* un ambiente multicellulare senza l'ausilio di uno scaffold o di un ambiente più complesso.
Ad esempio, Shu-Han Chang et al. (Chang et al., 2021) hanno realizzato un canale microfluidico, integrato ad una coltura con inserto Transwell®, osservando come la possibilità di realizzare una coltura in interfaccia aria-liquido ha permesso di realizzare un costrutto di barriera alveolo-capillare che mima quella fisiologica. Nello specifico il costrutto è stato analizzato sfruttando il valore della resistenza trans-epiteliale (TEER) e analizzando la formazione di giunzioni strette, tipiche della barriera emato-gassosa. Inoltre, il costrutto è stato stimolato esponendolo a vapori di etanolo ed alla produzione di citochine osservando, nel primo caso, la promozione della permeabilità della barriera, mentre nel secondo, la sua riduzione.
Un punto di forza che Tranwell® e Multiwell forniscono è che, essendo trasparenti, consentono di analizzare i campioni tramite colorazioni specifiche ed altri metodi di fissazione, oltre a consentire saggi e misurazioni, come la TEER (Resistenza elettrica transepiteliale), o analisi di vitalità cellulare (Chang et al., 2021; Lu et al., 2019).
Spesso le Transwell® vengono utilizzate in supporti di coltura chiamati Multiwell, (MW) piastre multipozzetto, realizzate in genere in policarbonato, poliestere, e, a volte, rivestiti di materiale di origine naturale, come il collagene (*Transwell® Permeable Supports | Guidelines for Use | Corning*, n.d.), per aumentarne l'adesività cellulare. In genere le dimensioni MW più diffuse sono quelle da 12, 24 ,48 e 96 pozzetti (Mazzei et al., 2010).
Uno dei vantaggi dell'utilizzo di questi sistemi è la possibilità di effettuare studi in parallelo a bassi costi, in quanto i volumi in gioco sono ridotti (Mazzei et al., 2010).

1.3.3 MODELLI DI COLTURA AVANZATI

Con modelli di coltura avanzati si intendono tutti quei sistemi di coltura in cui le cellule saranno inserite in un ambiente complesso, che sia il più biomimetico possibile. Inoltre, nel sistema ci possono essere più fenotipi cellulari, come normalmente avviene nei tessuti *in vivo*. Le cellule coltivate vengono sottoposte anche agli opportuni stimoli fisico-chimici per cercare di mimare il più possibile quello che accade nei tessuti reali (Sara Mantero et al., 2022).
I modelli di coltura complessi sono diversi, per primi tratteremo gli sferoidi e gli organoidi. Poi si passerà a parlare di modelli 3D ossia tutte quelle tecniche di coltura che puntano alla ricostruzione morfologica, fisica e biochimica del bioambiente *in vivo.* Queste tecniche di coltura sono rappresentate dall'ingegneria tissutale, dai sistemi microfluidici e dai bioreattori.

1.3.3.1 ORGANOIDI

Gli organoidi sono sistemi cellulari tridimensionali che vengono in genere coltivati in sospensione, dato che non sono ancoraggio dipendenti.
Gli organoidi sono formati da una popolazione cellulare eterotipica che deriva dall'autonomia delle cellule che interagendo tra di loro generano questi costrutti (Archer et al., 2021; Nadkarni et al., 2016). Le risorse cellulari sono le cellule staminali adulte e le pluripotenti, sia embrionali che indotte; coltivate in condizioni chimiche, fisiche e ambientali ottimali per le diverse risorse cellulari (Nadkarni et al., 2016).
È stato visto che con gli organoidi è possibile riprodurre il fenomeno dell'organogenesi dal momento che le cellule utilizzate sono di origine umana, in maniera tale da avere anche modelli umani costruiti *in vitro* (Archer et al., 2021; Nadkarni et al., 2016). Su questi sistemi si potrebbe investigare l'efficacia di nuovi farmaci, oppure studiare lo sviluppo di determinate patologie (Archer et al., 2021). Un altro aspetto molto importante è la possibilità di impianto *in vivo* (su animali), dal momento che i costrutti realizzati sono spesso immaturi e non esplicano le stesse funzioni di un organo cresciuto all'interno dell'ambiente fisiologico.
Ci sono due limiti importanti, rappresentati dal fatto che gli organoidi non sono dotati di un sistema di vascolarizzazione in grado di nutrire tutte le cellule del

costrutto, e neanche di un sistema di innervazione, fondamentale per l'omeostasi di qualsiasi organo *in vivo*, e per la guarigione. Inoltre, c'è un'elevatissima variabilità nella fonte cellulare, in quanto se si dovessero utilizzare le pluripotenti indotte prelevate da un paziente, la variabilità sarebbe introdotta dall'età e dallo sfondo genetico del paziente stesso, inoltre sulle stesse cellule anche il protocollo che un gruppo di ricercatori utilizza rispetto a quello utilizzato da altri può influire molto (Sara Mantero et al., 2022).
Inoltre, gli organoidi sono fonti molto preziose di cellule (biobanking) che possono essere anche manipolate geneticamente (Archer et al., 2021).
Spesso la coltura degli organoidi viene fatta su Matrigel, una matrice di origine animale diversa dalla ECM fisiologica, che potrebbe trasmettere virus alle cellule, nonostante i metodi di sterilizzazione.
Tuttavia, grazie alla capacità di espansione a lungo termine si possono creare organoidi tumorali con cellule prelevate da paziente. Questi organoidi sono molto preziosi, in quanto è possibile effettuare su di essi studi sull'efficacia di terapie per la medicina di precisione, oppure anche stratificazione del cancro mediante analisi omica. Infatti, sono stati realizzati diversi modelli di patologie, esempi sono gli organoidi che riproducono polmoni affetti della fibrosi cistica, o quelli che riproducono sistemi affetti da malattie infettive. Un grande esempio sono gli airways organoids (AOs) utilizzati da Norman Sachs et al. (Clevers H., 2022); nello studio sono stati utilizzati organoidi coltivati a partire da cellule di vari pazienti riproducendo tre casi differenti:

- Fibrosi Cistica (CF).
- Tumore polmonare.
- Infezione dal virus RSV.

Le cellule umane ottenute sono state prima trattate con BME (Basement Membrane Extract) e gli organoidi si sono poi formati in condizioni ottimizzate in qualche giorno. In tutti e tre i casi è stato dimostrato come gli AOs riproducano con alta percentuale il bioambiente *in vivo* e siano dei validi strumenti per il drug screening e per la medicina di precisione.
Non bisogna comunque dimenticare il fatto che questi modelli sono sempre privi degli elementi caratteristici che circondano il bioambiente tumorale, ossia: cellule endoteliali, fibroblasti e soprattutto cellule immunitarie (Corrò et al., 2020).
Gli organoidi poi possono essere coltivati anche con cellule staminali (Jensen & Teng, 2020), andando poi a costruire complessi cellulari che potrebbero essere trapiantati *in vivo* in umano; per ora sono stati fatti test solo su modelli animali, e

infatti, ad esempio, modelli murini hanno ricevuto con successo un innesto di modello renale (Cushing & Anseth, 2007; Jensen & Teng, 2020).

1.3.3.2 SFEROIDI

Gli sferoidi sono simili agli organoidi, infatti la coltura avviene anche qui in sospensione. Questi sistemi cellulari nascono grazie all'inserimento in coltura di cellule di diverso fenotipo le quali, mosse da gradienti (di nutrienti, di fattori di crescita, e di ossigeno) e per comunicazione paracrina[16], tendono a formare aggregati di forma sferica andando così a generare costrutti multicellulari simili, nella composizione cellulare, ai tessuti *in vivo*.
La formazione degli sferoidi è strettamente legata all'azione di proteine di legame intercellulare quali caderina e β-catenina.
Le tecniche di realizzazione sono diverse:

- Pellet Colture: tecnica nella quale le cellule vengono fatte depositare all'interno di una vial per coltura cellulare e sottoposte a centrifugazione. Poi si rimuove il surnatante mentre le cellule depositate vengono nuovamente sospese in un mezzo di coltura per sferoidi. Successivamente si distribuiscono in una piastra multipozzetto antiadesiva per le cellule (Hansoo Park, 2019).

- Liquid Overlay: le cellule vengono sospese in un mezzo di coltura per sferoidi su di una Petri realizzata con materiale antiadesivo, favorendo così la formazione degli sferoidi (Hansoo Park, 2019).

- Hanging Drop: spesso si parte dal coltivare le cellule su di un monostrato. Poi si diluisce la coltura 2D con del mezzo di coltura al fine di ottenere una densità ottimale di cellule. Dopo si trasferisce il tutto in una multi-well, con pozzetti micrometrici, e vi si pone sopra un coperchio. Alla fine, si capovolge il tutto e si

[16] Comunicazione paracrina: metodo di comunicazione intercellulare, in cui una cellula centrale comunica con tutte le altre che la circondano rilasciando un messaggero di tipo chimico, il quale andrà ad indurre variazioni nella loro fisiologia.

otterranno degli sferoidi all'interno delle gocce. Gli sferoidi si formano per gravità sul fondo delle gocce stesse (Hansoo Park, 2019).

- Spinner Colture: la coltura viene eseguita in un sistema in cui le cellule ed il mezzo di coltura sono mantenute in agitazione grazie all'azione di una barra rotante. La dimensione degli sferoidi e le condizioni di coltura dipendono rispettivamente dal volume del contenitore in cui si esegue la coltura e dalla forza di agitazione (Hansoo Park, 2019).

- Rotating Wall Vessel: gli sferoidi si formano grazie al mantenimento delle cellule in microgravità, che viene creata mantenendo il sistema di coltura in continua rotazione (Hansoo Park, 2019).

- Microfluidics: in questo sistema le cellule vengono inserite in un flusso all'interno di un microcanale permeabile all'ossigeno ed ai fattori di crescita (Hansoo Park, 2019).

- Magnetic Levitation: le cellule vengono mescolate con particelle magnetiche, e viene poi applicato un campo magnetico per mantenere le cellule in sospensione. In questa situazione le cellule diventano più grandi e si favorisce l'interazione intercellulare e quindi la formazione di sferoidi eterotipici (Hansoo Park, 2019).

Gli sferoidi hanno un grande limite rappresentato dall'assenza di vascolarizzazione, che non permette ai nutrienti di arrivare alle cellule più interne. Nello specifico, soprattutto quando le dimensioni degli sferoidi aumentano, si può osservare la formazione di tre strati ben distinti, uno esterno vitale a contatto con il mezzo di coltura ricco di nutrienti, uno strato in quiescenza ed il core necrotico per l'assenza di contatto con i nutrienti del mezzo di coltura (Hansoo Park, 2019). Per superare questo problema si ha la possibilità di coltivarli con delle particelle di diversi materiali che permettono di portare nutrienti all'interno dello sferoide.

Infatti, grazie a questi materiali è possibile regolare la differenziazione nel caso di sferoidi coltivati con cellule staminali; infatti, è stato visto che coltivando queste cellule sul grafene si indirizza la differenziazione in neurali dotate di alta sensibilità agli stimoli esterni (Hansoo Park, 2019). Oppure con le particelle si potrebbero andare ad alterare alcuni legami fra cellule adiacenti, tensione superficiale e forze meccaniche dentro lo sferoide, oppure alterare la distribuzione dei fattori di crescita determinando rispettivamente una differenziazione parziale oppure una differenziazione spazialmente controllata (Hansoo Park, 2019).
Gli sferoidi sono largamente utilizzati nell'ambito della ricerca per test di farmaci e Tissue Engineering o per lo studio di patologie. Un esempio è stato lo studio svolto da Ranu Surolia et al. (Surolia et al., 2017), in cui sono stati ricostruiti dei modelli di Fibrosi Polmonare Idiopatica (IPF) a partire da cellule di diversi pazienti. Nello specifico gli sferoidi realizzati sono stati chiamati "*pulmospheres*" ed hanno permesso di fare drug testing su diversi gruppi di pazienti. Infatti, dallo studio è emerso che alcuni pazienti rispondono bene ad un farmaco altri ad un altro, oppure è stato visto che in un gruppo di sferoidi la risposta si otteneva combinando i due farmaci. Allo stesso tempo è anche stato fatto un confronto con un modello 2D e è stato possibile vedere che a livello di espressione genica gli sferoidi hanno una similarità col modello *in vivo* molto più alta.
Yoshinori Imamura et al. (Imamura et al., 2015) hanno dimostrato come le colture 3D siano più predittive nella sperimentazione dell'efficacia di farmaci. Infatti, utilizzando diverse linee cellulari di tumore al seno e cellule prelevate da paziente, sono stati realizzati contemporaneamente degli sferoidi e delle colture 2D, e analizzando i livelli di Ki-67[17], caspasi-3 e caspasi-8, gli studiosi, hanno osservato che i modelli 3D hanno riprodotto più fedelmente la risposta tumorale *in vivo* e la sua resistenza alla terapia (Imamura et al., 2015).

1.4 SCAFFOLD

L'Ingegneria Tissutale (TE) è un ramo dell'Ingegneria Biomedica volta alla riproduzione *in vitro* di organi e tessuti a scopo di ricerca o per un eventuale successivo impianto *in vivo* su paziente. Le tecniche di TE si basano sull'utilizzo di supporti per la coltura cellulare in 3D chiamati scaffold.
Uno scaffold è un costrutto polimerico le cui caratteristiche chimiche, fisiche e morfologiche vengono opportunamente ingegnerizzate allo scopo di creare una struttura simile alla matrice extracellulare (ECM) biologica, al fine di promuovere l'interazione con le cellule (Sara Mantero et al., 2022).

[17] Ki-67: proteina indice del potenziale proliferativo tumorale, se il numero di cellule positive a questa proteina supera il 20% allora il tumore è da considerarsi aggressivo e altamente proliferativo.

Gli scaffold sono studiati in tutti i loro aspetti, che dipendono sostanzialmente dalla tecnica di fabbricazione e il materiale scelto.
Per la fabbricazione di scaffold, si può ricorrere a tecniche convenzionali o a tecniche di prototipazione rapida (o metodi non convenzionali).
I primi sono metodi più o meno rapidi come il solvent casting, gas foaming, wet/dry/melt/electrospinning, metodi per separazione di fase (per via o termica, o diffusiva o per reazione chimica) ed inversione di fase (Jensen & Teng, 2020). La precisione del metodo non è sempre ottimale ma i costi sono ridotti anche se con scarse scalabilità e riproducibilità (F. Liu & Wang, 2020).
Le tecniche non convenzionali, invece, si basano in genere o su tecnologia laser (per esempio la stereolitografia), metodi estrusivi (Fused Deposition Modeling, Pressure Assisted Microsiringe), oppure metodi di stampa 3D (Jensen & Teng, 2020; F. Liu & Wang, 2020). La precisione e la riproducibilità sono molto più importanti con queste tecniche, tuttavia, la scalabilità resta sempre un problema, pur essendo la velocità di processo più alta rispetto alla prima classe di metodi.
Un metodo innovativo è la Aerosol Jet 3D Printing, che è una tecnica di stampa tridimensionale senza contatto. In questa tecnica si genera un flusso di goccioline di aerosol su di un substrato facendole passare attraverso due "barriere" di gas che circondano il flusso di gocce (F. Liu & Wang, 2020).
Un'altra tecnica innovativa è la Double-Nozzle Low-Temperature Organ 3D Printing, una tecnica in cui si stampa una soluzione sol-gel a temperatura ambiente strato su strato sfruttando la solidificazione a diversi range di temperatura dei materiali estrusi. Con questa tecnica si possono stampare assieme materiali di diversa natura (naturali ed artificiali, con solventi organici ed inorganici) anche insieme a varie biomolecole. In più, si ha un'ottima fedeltà di stampa da una parte grazie all'ottima interazione fra complesso polimerico e carico cellulare, dall'altra per le ottime prestazioni delle sole cellule alle temperature di processo. Poi, la ridotta concentrazione di polimero impiegata consente di aumentare la densità cellulare; inoltre, si potrebbero realizzare costrutti di polimero sintetico, in cui vengono immerse le cellule per poi anastomizzare il costrutto con i vasi *in vivo* (F. Liu & Wang, 2020). In questo modo si ottengono un'ottima stabilità a lungo termine dei costrutti realizzati ed un'ottima interazione con l'ambiente *in vivo,* incrementando così le probabilità di successo della medicina rigenerativa (F. Liu & Wang, 2020).
Un atro scopo delle tecniche di stampa 3D è anche quello di realizzare organi su cui praticare esercizi di interventi chirurgici specialistici, infatti Liu G. et al (G. Liu et al., 2021) hanno riprodotto un polmone umano utilizzando dei materiali sintetici per la stampa del parenchima polmonare, dei vasi sanguigni e dei bronchi, poi hanno lasciato il giudizio delle caratteristiche visive e morfologiche a tre gruppi da dieci persone ciascuno composti da chirurghi esperti, neo-chirurghi e studenti di

medicina; ottenendo ottimi risultati in termini di riproduzione dell'organo (G. Liu et al., 2021).
I materiali polimerici sono la chiave per la realizzazione di strutture di supporto per le cellule e da essi dipendono le proprietà degli scaffold.

1.4.1 MATERIALI UTILIZZATI

Gli scaffold sono l'elemento di partenza per la coltura di cellule nella TE, i quali, però, devono rispettare determinati criteri in termini di progetto.
Nello specifico, gli scaffold devono essere **biocompatibili**, **bioattivi** e **biostabili** o **bioinerti**; in più, a volte devono essere **biodegradabili** e **bioriassorbibili** per far sì che i materiali si degradino facendo spazio al tessuto naturale che si viene a riformare; quindi, la cinetica di degradazione deve essere ben controllata (Bodenberger et al., 2017; Sara Mantero et al., 2022)
I materiali che vengono utilizzati nell'ingegneria tissutale per la produzione di scaffold sono sempre polimeri, i quali a loro volta possono avere diversa natura. Infatti, si classificano in:

- **Polimeri naturali**
- **Polimeri sintetici**

I *polimeri naturali* sono quelli che rispecchiano di più le proprietà della ECM e che quindi offrono le migliori prestazioni in termini di bioattività con le cellule. Tuttavia, il problema risiede nel fatto che per la loro origine ci sono problemi al livello di produzione su campo industriale, in quanto sono caratterizzati da un'intrinseca variabilità e le loro proprietà meccaniche non sono sempre soddisfacenti né sono compatibili con le tecniche di prototipazione. Come materiali si utilizzano in genere polisaccaridi della ECM detti **Glicosamminoglicani** (**GAGs**) o **mucopolisaccaridi**, formati da sequenze di un ammino-zucchero ed un acido uronico (eparin-solfato, condroitin-solfato, acido ialuronico, dermatan-solfato etc.). Oppure ci sono polisaccaridi di origine vegetale, batterica o animale (amido, alginato, chitosano, cellulosa, carraggenano).
Un altro tipo di polimeri naturali sono le proteine, che di nuovo possono essere tipiche della ECM (collagene e gelatina, fibronectina, laminina, vitronectina, fibrina, elastina) oppure possono non appartenere alla ECM (cheratina, fibre della seta, proteine dei Molluschi).
Vengo spesso impiegati anche idrogeli e biofilm, anche nella coltura di sferoidi, facendoli così crescere in un ambiente 3D.

Gli idrogeli sono dei materiali molto diffusi nell'ambito della coltura tridimensionale, e vengono prodotti promuovendone il crosslinkink mediante metodi fisici o chimici. Quindi, permettono di riprodurre un ambiente 3D ed idratato come quello *in vivo* e soprattutto sono impiantabili in umano in quanto biocompatibili e biodegradabili (Bodenberger et al., 2017).
Tuttavia, la loro produzione spesso porta a dover affrontare tre grandi limiti che sono l'eventuale bassa reticolazione, la formazione di intermedi tossici ed inoltre spesso il loro costo è alto a causa della scarsa disponibilità (Bodenberger et al., 2017). Per superare queste sfide sono stati introdotti degli idrogeli a partire dalle proteine del lievito estratte e trattate con un crosslinker per ottenere un idrogel alternativo, poco costoso e realizzabile in breve tempo; ed inoltre, grazie all'altissima disponibilità dei lieviti, il loro costo è bassissimo (Bodenberger et al., 2017). Questa nuova famiglia di idrogeli si sono rivelati resistenti a condizioni estreme di temperatura e PH e soprattutto biocompatibili (Bodenberger et al., 2017). Inoltre, la loro realizzazione tramite freez-drying ha permesso di realizzare una matrice con pori interconnessi con la possibilità di fornire nutrienti a tutte le cellule in un'eventuale coltura 3D svolta con un idrogel di questo tipo (Bodenberger et al., 2017).
Poi ci sono i *polimeri sintetici*, ossia quelli sintetizzati in laboratorio. Questi materiali sono ottimi in termini di proprietà meccaniche, chimiche e fisiche, in quanto essendo prodotti artificialmente, si possono modulare facilmente. In più, la produzione in laboratorio facilita l'allargamento a livello industriale con metodi di fabbricazione tradizionali e a basso costo. Tuttavia, spesso questi materiali hanno una rigidezza troppo alta che non li rende compatibili con le cellule in termini di bioattività, in quanto esse tendono ad aderire o meno in base alle caratteristiche del materiale sul quale vengono coltivate. Inoltre, anche nella realizzazione di scaffold si guarda molto alle caratteristiche morfologiche (assenza o presenza di porosità) che determinano le caratteristiche del materiale e l'esito dell'interazione con le cellule (Chung et al., 2018).
In termini di degradazione, invece, si rischia il rilascio di monomeri nocivi per le cellule *in vivo*: pochi polimeri tra quelli disponibili sono stati approvati dalla Food and Drug Administration (FDA). In questo caso, i materiali che vengono spesso utilizzati sono i poliesteri (PLA, PGA, PLGA, PCL, etc.), che sono polimeri degradabili per idrolisi dei legami esterei con prodotti di degradazione assolutamente non tossici ed eleminati dall'organismo ospite in forma di CO_2 ed H_2O, o i poliuretani, caratterizzati da un gruppo uretanico (isocianato + ossidrile alcolico) (F. Liu & Wang, 2020; Sara Mantero et al., 2022). Questa seconda classe di polimeri si realizza

a partire da un diisocianato[18] ed un macrodiolo[19], dai quali si forma un prepolimero, che viene poi trasformato in un poliuretano aggiungendo un estensore di catena alchilico, oppure si aggiunge una poliammina, così da ottenere un poliuretano urea (F. Liu & Wang, 2020; Sara Mantero et al., 2022). Il vantaggio assoluto di questi polimeri, è che si scelgono tutti i componenti a partire da quelli di partenza agli estensori di catene e/o poliammine; questo aspetto è molto importante perché consente di conoscere già quali saranno le proprietà del materiale ottenuto alla fine del processo.
Spesso gli scaffold vengono anche funzionalizzati[20] per migliorare l'interazione con le cellule, oppure per far rilasciare loro delle biomolecole fondamentali per la potenziale maturazione di un nuovo tessuto *in vivo*, oppure per rilasciare farmaco durante la degradazione.
Quindi nella fase di inizio di una coltura 3D è molto importante la scelta di un opportuno materiale con cui realizzare lo scaffold. Il materiale dovrà aiutarci a rispettare i criteri di biocompatibilità, bioattività e di proprietà morfologiche e fisico-chimiche su dette. Inoltre, il materiale detterà anche la tecnica di fabbricazione, che non dovrà risultare dannosa per lo stesso. Inoltre, è molto importante controllare la cinetica di degradazione del materiale che dovrà avvenire con i giusti tempi e senza alcun fenomeno di tossicità per le cellule o per l'organismo, in cui potenzialmente potrebbe essere inserito lo scaffold.
Oltre ai classici materiali polimerici si utilizzano anche scaffold che derivano dalla *decellularizzazione* di tessuto animale o dalle piante, come, ad esempio, gli scaffold realizzati a partire da cuori suini privati della parte cellulare, oppure scaffold di mela o di piante che sono state utilizzate in quanto la loro idrofilicità ed il trasporto di acqua attraverso la loro architettura favoriscono l'espansione cellulare su lunghi periodi (Fontana et al., 2017). Inoltre, le cellule possono adattarsi all'architettura offerta dallo scheletro vegetale delle piante, che viene prima decellularizzato e poi popolato con un certo fenotipo cellulare umano (Fontana et al., 2017).
In ambito polmonare è stato visto da Elizabeth A. Calle et al. (Cei et al., 2014) che partire da uno scaffold di tessuto umano permette di ottenere ottimi risultati. Infatti, nel loro studio è stato visto come uno scaffold polmonare umano abbia tutte le perfette caratteristiche meccaniche e morfologiche ideali per ricreare un modello di polmone *in vitro.* Tuttavia, il protocollo necessario all'implementazione del

[18] Isocianato: sono dei composti caratterizzati dalla presenza del gruppo funzionale dell'azoto (N) –N=C=O, che nei diisocianati e presente due volte.
[19] Macrodiolo: è un gruppo di polimeri appartenenti alla classe dei polioli, e che presentano nella catena gruppi ossidrilici.
[20] Funzionalizzazione: è un processo, eseguito con varie tecniche, allo scopo di aggraffare o incapsulare biomolecole o farmaci all'interno di biomateriali impiantabili oppure in nanoparticelle, per andare ad agire in maniera locale e specifica.

modello è molto complesso, in quanto bisogna prima decellularizzare il tessuto e sterilizzarlo, e solo dopo si possono coltivare le cellule all'interno di un ambiente 3D, monitorato e controllato, applicando gli opportuni stimoli. In più, va aggiunto che si i modelli *ex vivo* umani, sicuramente sono i migliori come caratteristiche per modelli di organi; tuttavia, la disponibilità non è alta e quindi sono difficili da reperire, dunque anche se meno simili ai modelli umani, scaffold come il Matrigel o scaffold di altri materiali, naturali o sintetici sono ancora la soluzione più utilizzata e con buoni risultati (Mishra et al., 2012).
Un aspetto che però deve essere messo in conto nella coltura 3D, e quindi nella TE, è l'inserimento di opportuni sistemi di stimolazione che possano andare a predisporre, *in vitro,* le cellule al ruolo che magari potrebbero, poi, dover svolgere *in vivo*. Nello specifico si integrano alla coltura sistemi elettro-meccanici per la stimolazione cellulare, in questo modo oltre a fornire i nutrienti, si riesce a riprodurre la stimolazione tipica del bioambiente naturale, che nel caso delle cellule staminali potrebbe indirizzare la differenziazione verso un fenotipo desiderato, oppure, più in generale, potrebbe far maturare i costrutti *in vitro* (Sara Mantero et al., 2022). A questo scopo sono stati sviluppati dispositivi ad hoc come i
sistemi microfluidici ed i bioreattori (Sara Mantero et al., 2022).

1.5 BIOREATTORI

Nel tentativo di creare colture tridimensionali che riproducessero l'ambiente biologico *in vivo* si è cercato di introdurre dei sistemi di stimolazione. Infatti, gli stimoli sono molto importanti per mantenere le cellule in coltura e/o per indirizzarne correttamente il differenziamento; ed i bioreattori sono stati i primi ad essere nati per svolgere questo compito (Sara Mantero et al., 2022).
Infatti, un bioreattore viene definito come un sistema di coltura dinamica, in cui, tramite opportuni stimoli chimici e fisici, si promuove lo sviluppo di processi biologici *in vitro* in condizioni monitorate e controllate (Martin et al., 2004).
Per assicurare lo svolgimento del loro compito, i bioreattori per coltura cellulare devono rispettare determinati requisiti fondamentali (Sara Mantero et al., 2022), che sono:

- **Affidabilità del sistema**: il sistema deve mostrarsi affidabile a lungo termine, dato che spesso le colture richiedono tempi lunghi (Sara Mantero et al., 2022).

- **Modularità**: il sistema deve essere scomponibile in più componenti possibili, per facilitare anche eventuali modifiche delle singole parti, per aumentarne l'affidabilità (Sara Mantero et al., 2022).

- **Costi ridotti** (Sara Mantero et al., 2022).

- **Compatibilità con le procedure di laboratorio**: il sistema deve essere sterile e mantenuto tale il più a lungo possibile. Nello specifico deve essere manovrato con guanti sterili, ed il numero di passaggi richiesti deve essere il più basso possibile (Sara Mantero et al., 2022).

- **Sterilizzabilità delle parti a contatto con il mezzo di coltura e con le cellule**: queste parti devono poter essere sterilizzate con i metodi tradizionali di laboratorio, mentre le altre possono essere anche semplicemente pulite. La scelta dei metodi di sterilizzazione e pulizia dipende anche dal materiale con cui viene fabbricato il bioreattore. Questo in realtà è un requisito non necessario, dal momento che esistono bioreattori monouso sterilizzati al momento della fabbricazione, ma averne uno sterilizzabile ridurrebbe i costi di esperimento (Sara Mantero et al., 2022).

- **Ingombro ridotto**: il bioreattore deve poter entrare in incubatore e quindi lo spazio occupato deve essere ridotto al minimo necessario. Un possibile sviluppo futuro potrebbe essere la realizzazione di bioreattori, che svolgano anche la funzione di incubatori (Sara Mantero et al., 2022).

- **Facilità di regolazione dei parametri di stimolazione**: il sistema deve essere semplice da utilizzare, e deve sempre disporre di una guida per l'interfaccia utente, che lo renda disponibile al maggior numero di operatori possibile (Sara Mantero et al., 2022).

- **Facilità di ricambio del mezzo di coltura:** il mezzo di coltura è la chiave del mantenimento delle cellule in coltura, in quanto è quello che porta i nutrienti. Dunque, è fondamentale che questo possa essere ricambiato con facilità, preferibilmente con un sistema automatizzato (Sara Mantero et al., 2022).

In base al loro funzionamento, i bioreattori possono essere classificati in **non fisiologici** e i **fisiologici**. Alla prima classe appartengono i bioreattori chiamati spinner flask (o stirred flask) e quelli a pareti rotanti. I primi mantengono le cellule ed il mezzo di coltura in continua rotazione grazie ad un albero messo in rotazione (in genere 50-80 rpm) o per azione meccanica o magnetica. Le colture vengono eseguite su scaffold in sospensione nel mezzo, oppure fissati sul pistone rotante.
I bioreattori a pareti rotanti sono quelli in cui le pareti sono mantenute in continua rotazione; quest'ultima permette di ottimizzare la distribuzione cellulare e va a bilanciare la gravità grazie alla forza idrodinamica che si forma nel sistema.
Invece, alla seconda categoria appartengono dei bioreattori, in cui ci si distacca dalle strutture di coltura tradizionali e si introducono sistemi di stimolazione che cercano di mimare gli stimoli fisiologici. In questa classe di bioreattori vengono inseriti quelli che generano stimoli di compressione e/o trazione, in cui lo scaffold viene fissato a degli opportuni supporti i quali inducono la stimolazione. Oppure, si può avere stimolazione grazie all'azione di un fluido, come nei bioreattori a pressione idrostatica, in cui un pistone va ad aumentare la pressione nella camera piena di mezzo di coltura. Appartengono a questa classe anche i bioreattori a perfusione, in cui il mezzo di coltura viene perfuso attraverso lo scaffold e le cellule, andandole a stimolare grazie alla perfusione stessa.
Esiste una seconda classificazione dei bioreattori, nella quale questi vengono distinti in monocamerali, in cui c'è a disposizione una sola camera per la coltura, e multi-camerali, i quali offrono più camere di coltura, che possono essere messe o in serie o in parallelo, creando più costrutti dando maggiore validità allo studio in base alla ripetitività dei risultati, ma si ha un maggiore ingombro. In più posso mettere in connessione costrutti diversi, simulando l'interconnessione fra gli organi.
In ambito polmonare si sta cercando si riprodurre l'interfaccia aria liquido della barriera alveolo-capillare per cercarne di mimare i meccanismi fisiologici e patologici. Uno dei bioreattori realizzati in questo ambito è il bioreattore MALI, composto da due camere una con mezzo di coltura e l'altra con aria, e fra di esse una membrana porosa elettrofilata in policarbonato(uretano), sulla quale sono state fatte aderire le cellule A549 (Human epithelial-like cell line from lung adenocarcinoma) (Cei et al., 2014).
Grazie all'elasticità della membrana ed all'esercizio di una sovrapressione è stato possibile replicare i movimenti indotti dalla respirazione al tessuto polmonare ed è stato riprodotto il meccanismo di deposizione di nanoparticelle sulle cellule volto a mimare lo stesso fenomeno *in vivo,* ottenendo ottimi risultati (Cei et al., 2014). Lo stesso bioreattore è stato poi modificato per ricreare un modello in cui le cellule

sono state esposte a nanoparticelle, fatte diffondere nel sistema grazie ad un nebulizzatore, che era stato montato sopra la camera apicale. L'esposizione venne fatta mentre le cellule venivano anche stimolate ciclicamente grazie all'esercizio di una pressione in maniera ciclica. In quest'ultimo caso la membrana utilizzata era la cosiddetta Bioinspired Stretchable Membrane (BETA), ossia una membrana in PCL/GL in concentrazioni, rispettivamente, 9.35% w/v e 6.34% w/v. In questo modo gli autori sono riusciti a riprodurre contemporaneamente la deformazione ciclica polmonare, come accade nella respirazione, l'uptake delle particelle a cui il costrutto era stato esposto ed il trasporto trans epiteliale delle stesse particelle. Inoltre, per la barriera alveolo-capillare è stata fatta una co-coltura di cellule A549 e cellule umane epiteliali (16HBE14o-) (Doryab et al., 2021).
Con i bioreattori è anche possibile studiare fenomeni di patologie come tumori, ed analizzarli a vari time step e osservare la loro resistenza ad una terapia (Mishra & Kim, 2018). Dhruva K. Mishra e Min P. Kim (Mishra & Kim, 2018) hanno, infatti, realizzato un bioreattore nel quale hanno inserito un polmone murino decellularizzato. La struttura polmonare dopo la rimozione delle cellule era rimasta integra a livello di componenti proteici e a livello morfologico e quindi era terreno fertile per la coltura di vari fenotipi cellulari (cellule tumorali polmonari, fibroblasti polmonari, cellule del tumore al seno e cellule del sarcoma). È stato quindi studiato lo sviluppo del tumore primario al polmone e la formazione di metastasi analizzando le cellule in diversi momenti dello sviluppo del tumore. Questo è un modello che permetterà anche di studiare l'interazione fra le cellule tumorale e quelle immunitarie, che potrebbero essere innestate all'interno del costrutto polmonare, oppure si potrebbe testare l'efficacia di nuovi farmaci contro queste patologie (Mishra & Kim, 2018).
Per cercare di riprodurre il crosstalk fra organi si mettono anche più camere di coltura in serie (Mazzei et al., 2010). D. Mazzei et al (Mazzei et al., 2010) hanno realizzato un Bioreattore modulare Multi-Compartimentale (MCmB). In questo modello si potrebbero inserire direttamente delle Multiwell per svolgere più studi in parallelo; tuttavia, ci sono problemi legati al fatto che la camera ed il sistema sono realizzati in PDMS, che come già detto, non è un materiale ottimale per questo tipo di studi (Mazzei et al., 2010; Zamprogno et al., 2021). Inoltre, tessuti cresciuti su di un supporto di piccole dimensioni non saranno mai come quelli *in vivo* ed inoltre si ha spesso a che fare con gli "effetti di bordo", in quanto le cellule che crescono sui bordi del terreno di coltura sono più tese e diverse rispetto a quelle che crescono al centro della camera (Mazzei et al., 2010).
I bioreattori restano comunque un ottimo strumento di studio preclinico e con buona predittività di quello che accade *in vivo* (Sara Mantero et al., 2022) anche se

spesso gli operatori devo essere insigniti a lavorare con queste nuove tecnologie (Mazzei et al., 2010).

1.6 SISTEMI MICROFLUIDICI

I sistemi microfluidici sono dispositivi in cui è possibile effettuare la coltura cellulare 3D in condizioni dinamiche. Nel senso esteso della parola rientrano nella classe dei bioreattori; tuttavia, rispetto alle tecnologie tradizionali su dette le loro dimensioni sono notevolmente ridotte. Questi sistemi, come suggerisce il loro nome, permettono di riprodurre su scala micrometrica ciò che accade all'interno del bioambiente reale *in vivo*. La coltura dinamica è resa possibile grazie ai canali microfluidici, in cui il mezzo di coltura si muove sfruttando un flusso laminare[21].
In un fluido in movimento entrano in gioco le forze viscose e le forze di inerzia, e dal loro confronto è possibile stabilire il regime di moto e questo confronto è espresso dal rapporto fra le due forze tramite il Numero di Reynolds (Re), in cui a denominatore ci sono le forze viscose e a numeratore le forze d'inerzia. L'Re è quindi espresso dalla seguente espressione:

$$Re = \frac{\rho * v * L}{\mu}$$

In cui:

- ρ = densità del fluido d'interesse, che qui è il mezzo di coltura.
- v= velocità del fluido nel canale.
- L= lunghezza caratteristica del mezzo in cui si muove il fluido, che nel caso di un canale corrisponde al suo diametro.
- μ = viscosità dinamica del fluido.

Il flusso laminare si manifesta a valori bassi di Re e quindi quando dominano le forze viscose del fluido. Inoltre, come si vede dalla formula, entra in gioco anche la geometria del sistema in cui il fluido scorre e con quale velocità.

[21] Flusso laminare: regime di moto in cui i filetti fluidi scorrono perfettamente l'uno sull'altro senza che vi siano miscelamenti, grazie al dominio delle forze viscose, e le particelle fluide si muovono in maniera ordinata e con direzione ben precisa.

Infatti, per *Re*≤2000 si ha flusso laminare, se 2000<*Re*≤4000 allora si è nella fase di transizione, ed infine se *Re*>4000 allora si è nel caso di regime turbolento[22].
Non a caso, nei sistemi microfluidici, il diametro dei canali in genere è inferiore ai 100 µm, ed entrano in gioco flussi ridotti; quindi, i valori di *Re* sono molto bassi e quindi il numero di Reynolds rimane ben al di sotto di 2000 dati i piccoli numeri in gioco. Inoltre, la turbolenza va evitata, soprattutto con le cellule, in quanto risulta dannosa per le stesse, infatti, se per esempio si avessero in coltura delle cellule staminali si potrebbe innescare un differenziamento non voluto, oppure magari se ci fossero delle proteine circolanti nel mezzo di coltura la turbolenza potrebbe farle collidere e quindi mutarle in forme denaturate.
I vantaggi nell'utilizzare i sistemi microfluidici risiedono anche sulla piccola scala, che permette di fare ricerca utilizzando piccoli volumi, quindi meno solventi e meno cellule, riducendo così tempi e costi di sperimentazione, aprendo le possibilità per analisi ad alte prestazioni (high throughput screening).
La microfluidica potrebbe essere un potentissimo strumento per la ricerca in ambito farmaceutico per il test di farmaci, oppure per modellare la genesi di varie patologie o anche solo per emulare il bioambiente *in vivo* (Chung et al., 2018).
La tecnica di fabbricazione che più viene utilizzata per la realizzazione di questi dispositivi è la soft litography, che più si adatta al Poli Dimetil Silossano (PDMS), un materiale siliconico che è trasparente, permeabile all'ossigeno e a basso costo, largamente utilizzato per produrre i sistemi microfluidici (Chung et al., 2018).
Altri vantaggi della tecnologia microfluidica risiedono sicuramente nella maggior automazione, che implica un minor coinvolgimento della manodopera umana e quindi meno possibilità di errore. Inoltre, i processi vengono monitorati e controllati in tempo reale, a si aggiunge una maggior compattezza e semplicità di utilizzo.
Altri materiali, proposti come alterative al PDMS, sono il vetro, la carta ed altri polimeri, che però, o per motivi di difficoltà nella fabbricazione o per motivi di costo della materia prima, non sono ancora entrati in pieno utilizzo ma sono in fase di sperimentazione.
La riproduzione degli organi *in vitro* mediante i sistemi microfluidici potrebbe poi dare un grande aiuto alla medicina di precisione, dal momento che si avrebbe la possibilità di utilizzare le cellule dei pazienti e così dar vita ad un modello dell'organo patologico del paziente e fare drug testing su di esso al fine di trovare la terapia ottimale (medicina personalizzata). I modelli di organi all'interno di sistemi microfluidici vengono identificati con il termine organ on a chip. Questi chip

[22] Regime turbolento: flusso in cui le forze d'inerzia del fluido dominano su quelle viscose. E le particelle del fluido si muovono poi con moto caotico dominato senza seguire delle traiettorie precise.

potrebbero fornire una potente alternativa ai modelli animali anche a livello d'indagine preclinica, migliorando la predittività degli studi in quanto si potrebbero utilizzare cellule umane.

1.6.1 ORGAN-ON-CHIP

Con organ-on-chip si indicano tutti quei modelli microfluidici in cui si cerca di mimare il funzionamento di un solo organo in un chip microfluidico. Gli organ-on-chip si sono rivelati strumenti fondamentali per riprodurre la barriera alveolo capillare *in vitro* ed emulare l'esposizione a potenziali agenti patogeni o a particelle tossiche, e trovare dei trattamenti.
Dongeun Huh et al. (Huh et al., 2010), hanno sviluppato un modello microfluidico di barriera alveolo capillare diviso in tre canali, uno centrale e due laterali. Nel canale centrale è stata fatta una coltura, in cui è stata messa nell'intermezzo una membrana porosa in PDMS. Nello specifico è stata fatta una coltura ad interfaccia aria-liquido (ALI), con le cellule epiteliali coltivate nella parte superiore (in aria) e quelle endoteliali nella parte basale (nel mezzo) ad emulare la parte vascolare. Inoltre, la membrana in PDMS era stata funzionalizzata con le proteine della ECM (fibronectina o collagene) per favorire l'adesione delle cellule epiteliali ed alveolari. Nei canali laterali invece veniva fatto il vuoto per generare una pressione che andasse a stimolare le cellule simulando gli atti respiratori. Inoltre, esponendo il modello a delle nanoparticelle, è stato osservato che la deformazione ciclica, tipica della respirazione, accentua la risposta infiammatoria contro queste nanoparticelle ed inoltre, incrementa l'adsorbimento epiteliale ed endoteliale delle stesse, e quindi il loro passaggio nell'area vascolare sottostante, osservando lo stesso comportamento in dei polmoni murini. In più, è stato possibile riprodurre la risposta immunitaria polmonare contro i batteri. Infatti, il modello è stato esposto al batterio *Escorichia Coli,* marcato con la proteina fluorescente verde (GFP), ed è stato visto che la presenza del patogeno ha attivato l'endotelio ed ha così innescato la trasmigrazione dei neutrofili, che, passato l'endotelio, hanno fagocitato il batterio; inoltre, è stata osservata anche la produzione di citochine e di fluido essudato nel costrutto alveolare a causa dell'esposizione.
Il PDMS, però, ha presentato grandi problemi applicativi, in quanto può assorbire e/o adsorbire soluti e altre biomolecole che rendono l'ambiente di coltura non più biomimetico ed inoltre richiede di essere pretrattato prima del contatto con mezzo e cellule (Zamprogno et al., 2021). Inoltre, la tecnica di fabbricazione di soft

litography è costosa ed inoltre le proprietà del PDMS non sono come quelle della ECM polmonare cellule (Zamprogno et al., 2021). Quindi, Pauline Zamprogno et. Al cellule (Zamprogno et al., 2021), hanno realizzato una membrana in collagene-elastina (CE) che ha dimostrato di raggiungere le proprietà tipiche della struttura della barriera alveolo-capillare gestendo le percentuali dei due componenti e grazie alla loro origine biologica non è richiesto un pretrattamento. Infatti, sono state co-coltivate cellule epiteliali polmonari ed endoteliali alveolari prelevate da paziente realizzando un sistema altamente biomimetico della barriera emato-gassosa cellule (Zamprogno et al., 2021). Il dispositivo che sfrutta la membrana CE è stato quindi realizzato in due parti, quella superiore in PDMS e quella inferiore in policarbonato lasciando in mezzo il vuoto dove innestare un mesh d'oro rivestita con collagene ed elastina e dove eseguire la co-coltura cellule (Zamprogno et al., 2021). Una tecnica che ha quindi permesso di replicare l'ambiente fisiologico ma alterando le caratteristiche dalla membrana, e con cui si potrebbe riprodurre anche un tessuto polmonare patologico cellule (Zamprogno et al., 2021).
Si parla di multi-organ-on-chip, invece, per indicare un dispositivo in cui si creano, in microfluidica, dei modelli di più organi, che vengono messi in comunicazione fra di loro. Nello specifico questo aspetto è molto importante per lo studio di come il crosstalk fra gli organi possa influenzare l'esposizione a determinati agenti patogeni, oppure semplicemente potrebbero rivelarsi utili per vedere come un farmaco vada ad avere effetti su un altro organo verso il quale non era stato destinato.
Katharina Schimek et al. (Schimek et al., 2020), hanno sviluppato un chip nel quale hanno realizzato un modello di polmone e con degli sferoidi, ed un modello epatico connessi fra di loro. In questo studio è stato analizzato come l'esposizione a determinate sostanze ha una tossicità ridotta per le cellule polmonari grazie all'attività metabolica epatica.
Riprodurre il modello di fegato è molto importante, in quanto il fegato è l'organo che va a metabolizzare tutte le sostanze che ingeriamo nel nostro corpo, e spesso capita che alcuni farmaci che superano lo studio preclinico in animale vanno poi a fallire durante l'indagine clinica. La causa di questo fallimento è appunto la tossicità epatica, non prevedibile in animale, dal momento che il metabolismo, e l'organo in sé, in un organismo animale, sono diversi da quelli in umano. Oltre ad avere un modello epatico *in vitro*, è utile vedere come il crosstalk fra più organi possa avere effetti sull'esposizione a certe sostanze.
Inoltre, alcuni studi con modelli di polmone on chip sono stati incentrati sugli effetti dell'esposizione a nanoparticelle in quanto, ad esempio, il tasso d'inquinamento

nel mondo contemporaneo è molto alto, e l'osservazione degli effetti dell'esposizione a nanoparticelle ha destato molto interesse (M. Zhang et al., 2018). Min Zhang et al. (M. Zhang et al., 2018) hanno realizzato un modello di lung-on-chip facendo una co-coltura di cellule immortalizzate epiteliali polmonari umane (HAPAEpiCs), che poi hanno espresso il fenotipo delle ATII, e cellule endoteliali del cordone ombelicale umano (HUVEC). La coltura è stata fatta su Matrigel ed il chip è stato suddiviso in tre canali, nei laterali le HUVEC da un lato e le HAPEApiCs dall'altro e al centro la membrana in Matrigel a cui le cellule aderivano, ricostruendo così un'architettura ed un bioambiente simili a quelli della barriera alveolo-capillare *in vivo.* La coltura è stata fatta in interfaccia liquido-liquido ed in condizioni dinamiche con le cellule esposte a nanoparticelle di TiO_2 e di ZnO. In entrambi i casi è stato visto che le nanoparticelle risultano tossiche e dannose per l'integrità della barriera emato-gasossa, in quanto aumentano la permeabilità della barriera ed il tasso di apoptosi cellulare in una maniera dose-dipendente; fenomeni accompagnati dalla formazione di ROS[23].
Tuttavia, è stato osservato che fra co-coltura di endoteliali ed epiteliali e monocoltura si sole epiteliali polmonari c'è una grande differenza di livelli di tossicità, che nel primo caso è molto più bassa (M. Zhang et al., 2018).
Un ulteriore step è rappresentato dalla possibilità di realizzare un modello di un intero organismo umano in un dispositivo microfluidico, andando a parlare, quindi, di human-on-chip. In questo caso si crea un chip, in cui si modellizzano tutti gli organi, interconnessi fra di loro grazie ai canali microfluidici che vanno ad emulare il sistema vascolare.
Questa tecnologia è molto importante perché se ognuno di noi avesse un chip personalizzato si potrebbero personalizzare i trattamenti per ogni paziente andando ad aumentare la percentuale di successi delle terapie (Mittal et al., 2019). Poi, sempre a livello di studi preclinici, si potrebbe vedere come un farmaco, somministrato con varie tecniche, va ad essere distribuito a livello sistemico, come viene assorbito e poi escreto, applicando così il metodo ADME (Administration, Distribution, Metabolism, Excretion) on chip, riducendo tempi e costi di studio (Mittal et al., 2019).
I sistemi on chip quindi si rivelano strumenti molto potenti anche nella sperimentazione di terapie innovative basate, ad esempio, su nanoparticelle (Meghani et al., 2020). Nileshkumar Meghani et al. (Meghani et al., 2020) hanno realizzato un modello di polmone on chip in cui è stata testata l'efficacia di

[23] ROS: Reactive Oxigene Species, noti anche come radicali liberi, sono specie chimiche che se in alta quantità generano stress ossidativo pel le cellule e quindi apoptosi.

Quantum Dot (QD)[24] di ZnO PH sensibili, caricati su nanoparticelle di siero umano di albumina dal diametro di 60 nm. Il modello on chip in questo caso era di una barriera emato-gassosa tumorale ottenuta grazie alla co-coltura della linea cellulare A549 e fibroblasti, osservando che le nanoparticelle sono risultate citotossiche nell'ambiente tumorale in quanto i QD, sensibili al PH acido del tumore, rilasciavano Zn^{2+} che andava ad indurre l'apoptosi delle cellule tumorali grazie all'effetto EPR[25].

Per cercare di migliorare i modelli on-chip sono stati introdotti anche dei biosensori al fine di migliorare il monitoraggio dei parametri cellulari e/o dell'efficacia di un eventuale farmaco testato on chip (Ding et al., 2021).

[24] Quantum Dot (QD): sono nanostrutture di semiconduttore che se eccitate sono in grado di emettere a specifiche lunghezze d'onda.

[25] EPR effect: effetto di permeabilità e ritenzione aumentate nei tumori, che si verifica in quanto i tumori hanno un'elevata vascolarizzazione e che si forma in maniera rapida. E per la rapidità con cui si forma i vasi sono molto permeabili a nanoparticelle che tramite essi vengono così rilasciate nel tessuto tumorale ed in esso trattenute.

CAPITOLO 2: MATERIALI E METODI

2.1 MATERIALI

Di seguito verranno illustrati i materiali utilizzate in questo lavoro di tesi. In particolare, si parlerà del bioreattore utilizzato come supporto di coltura. Poi, si parlerà dei materiali utilizzati per realizzare la membrana, fabbricata mediante la tecnica di elettrospinning, che verrà illustrata più avanti. In fine si parlerà anche dei materiali utilizzati per marcare le cellule.

2.1.1 BIOREATTORE IVTech S.R.L.

L'azienda IVTech S.R.L. ci ha fornito un bioreattore per la coltura cellulare (definito LiveBox), composto da diverse parti, assemblabili con un sistema a incastri. Il bioreattore è realizzato per injection molding utilizzando silicone di grado medico.
I liveBoxes sono disponibili in due configurazioni, LiveBox1 e LiveBox2. Le due configurazioni differiscono dal fatto che la prima è a camera unica mentre l'altra bicamerale.

Figura 10: LB2 assemblato e racchiuso all'interno del "clamp system"

Nel nostro studio è stata utilizzata la camera LiveBox2.Le due camere del LiveBox2 hanno volumi differenti, la parte basale è più piccola di quella apicale, nello specifico i volumi sono rispettivamente di 1 mL e di 1.5 mL.
Nell'intermezzo fra le due camere è possibile porre una membrana porosa che viene inserita in un sistema di serraggio (*holder*), in modo tale da avere una superficie

planare. Il design della camera con la membrana è stato studiato per contrastare la formazione di bolle d'aria che potrebbero alterare e disturbare il sistema.

Figura 12: camera basale

Figura 11: camera apicale

A corollario del bioreattore ci sono diversi sistemi di supporto:

- LiveFlow: una pompa peristaltica con due teste pompanti in cui si ha la possibilità di scegliere un flusso fra 50 µL/min e 500 µL/min a passi di 10 µL/min. Inoltre, è possibile scegliere la direzione del flusso.
  In ciascuna testina sono presenti due tubi in silicone medico per un totale di quattro circuiti indipendenti.

- Clamp System: il bioreattore è alloggiato su di un supporto tramite il quale è possibile mantenere in posizione stabile il sistema e garantire la tenuta idraulica in fase di lavoro.

Figura 13: s-shape del clamp system

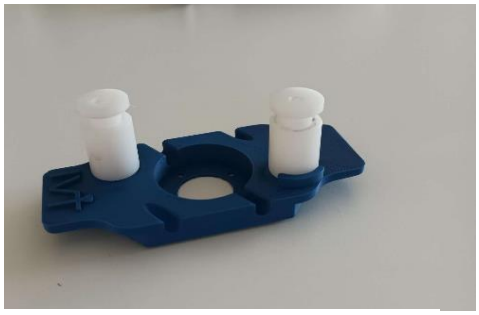


Figura 14: supporto del clamp system

Figura 15: low friction ring

- **Reservoir**: contenitore nel quale si pone il mezzo di coltura fresco. In questo contenitore si mescolano il mezzo di coltura esausto in uscita dal bioreattore, e il mezzo fresco. Nel caso in cui si lavori a circuito chiuso (ricircolo di mezzo), per la LB1 ne viene utilizzato uno solo, mentre per la LB2 si utilizzano uno per ciascuna camera. Nel caso in cui si lavora a circuito aperto (ogno circuito ha la riserva di terreno fresco, o *fresh*, e riserva di terreno di scarto, o *waste)*, i reservoirs raddoppiano di numero,

- **LivePa**: sistema di applicazione di una sovrapressione statica nel bioreattore tramite pistone idraulico che agisce sui tubi del bioreattore stesso. È possibile impostare: il range di flusso a cui si sta lavorando (50-90, 100-190, 200-290, 300-500 µL/min) ed il valore di passo incrementale che si vuol applicare.

- **tubi siliconici**: dal diametro interno di 1 mm e 2 mm, rispettivamente per quelli in ingresso e quelli in uscita dalla camera, sono elementi flessibili, sterilizzabili e permeabili ai gas che permettono di collegare tutto il sistema. I tubi e il bioreattore sono connessi tra di loro grazie a connettori fluidici di tipo Lur-Lock.

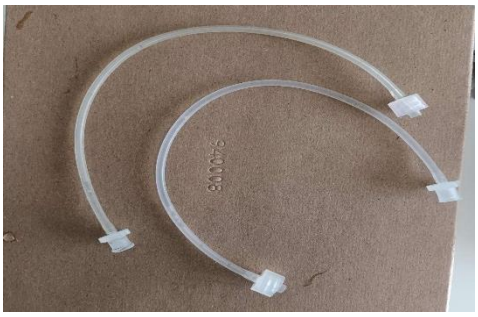


Figura 16: tubi siliconici

L'azienda IVTech S.R.L. ha inoltre fornito delle membrane porose in Poli-Etilen-Tereftalato (PET) con pori dal dimetro di 45 μm dallo spessore di 0.1 mm.
Il PET è un polimero termoplastico appartenente alla famiglia dei poliesteri; la sua temperatura di fusione è 245-260°C con una temperatura di transizione vetrosa intorno ai 69°C ed è insolubile in acqua. Il polimero deriva dalla reazione di esterificazione fra l'acido 1,4-benzendicarbossilico (acido tereftalato) e l'1,2-etandiolo (glicole etilenico), riportata in figura 16.

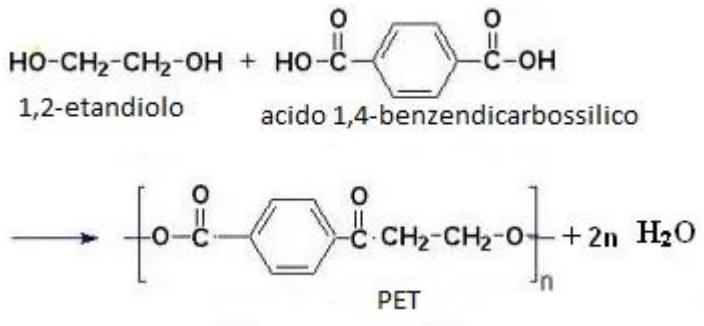


Figura 17: polimerizzazione del PET

Il PET si contraddistingue per la sua buona biocompatibilità, con questo polimero si possono realizzare strutture microporose ed intrecciate note come Dacron®. Questo materiale è stato largamente utilizzato nell'ambito cardiovascolare per le sue proprietà viscoelastiche cui si aggiunge una buona stabilità a lungo termine e grande uniformità di struttura (Amabili M, 2020; Çaykara et al., 2020). Inoltre, il PET è stato anche utilizzato per produrre scaffold, realizzando fibre miste di PET e collagene, creando fibre elettro filate in uno studio preliminare che ha mostrato che grazie al connubio fra le buone proprietà meccaniche del PET e le proprietà biologiche del collagene si possono creare scaffold che potrebbero avere ottime prestazioni in bioingegneria (Drobota et al., 2020).
Le sue proprietà meccaniche lo hanno comunque reso un materiale che non riesce ad anastomizzarsi perfettamente con il comparto arterioso sul lungo termine date le differenze di rigidezza dal tessuto fisiologico (Bustos et al., 2016).
Il PET è dotato anche di grande resistenza alle abrasioni e agenti chimici (Çaykara et al., 2020). Tuttavia, è stato visto che questo materiale è facilmente soggetto a contaminazione batterica e quindi per prevenire questo fenomeno è necessario sottoporlo a diversi trattamenti (Çaykara et al., 2020).

In un altro studio, invece, è stato osservato che il PET è risultato tossico per le cellule progenitrici mesenchimali ed endoteliali (Lykov AP, 2019).

2.1.2 GELATINA (GL)

La gelatina è una proteina idrosolubile derivata dall'idrolisi parziale del collagene, una proteina fibrosa insolubile e costituente principale della ECM nei tessuti animali, tra cui pelle, cartilagine, ossa e polmone (Bradley et al., 1974; Campiglio et al., 2019; Rajzer et al., 2014), e di cui la GL presenta, quasi, le stesse proprietà (Rajzer et al., 2014), ossia: biodegradabilità, biocompatibilità, facilità di alterazione chimica (crosslinking, funzionalizzazione) ed abbondante in natura. In generale, il collagene nasce dal tropocollagene, che ha una struttura a tripla elica destrorsa che nasce da tre α-eliche sinistrorse legate fra loro. Le triple eliche del tropocollagene interagiscono poi fra di loro assemblandosi in una struttura gerarchica, che può formare 28 tipi diversi di collagene in base al modo in cui le triple eliche si interconnettono (Law et al., 2017). Tuttavia, va detto che il collagene è un materiale che è ha costi elevati; inoltre, se lo si deve utilizzare come materiale per scaffold va co-polimerizzato co materiali sintetici a causa delle limitate proprietà meccaniche per tale scopo, inoltre c'è il rischio di trasmissione di patologie animali e il costo di purificazione è molto alto (Drobota et al., 2020; Law et al., 2017).
La GL ha un peso molecolare compreso 20 e 200 kDa e si organizza in una struttura eterogenea composta da catene singole (α-eliche), che si possono andare a legare covalentemente o a coppia o a triplette andando a formare rispettivamente catene-β o catene-γ (Ahmady & Samah, 2021). La GL è composta da un totale di 18 diversi amminoacidi (AA) legati in maniera covalente e relativamente ordinata; i tre AA più importanti della GL sono Glicina, Prolina ed Idrossiprolina, in particolare quest'ultime due, sono fondamentali per l'effetto di gelificazione del biopolimero (Ahmady & Samah, 2021). Nella GL sono presenti amino gruppi e gruppi carbossilici di acido aspartico e acido carbossilico (Ahmady & Samah, 2021), che sono ionizzabili e si possono sfruttare come siti di copolimerizzazione; inoltre, il biopolimero presenta la sequenza Arginina-Glicina-Acido aspartico (RGD) che viene riconosciuta naturalmente dalle integrine delle cellule come sito preferenziale di adesione (Hivechi et al., 2021).
La GL viene largamente applicata nella TE per la sua compatibilità e biodegradabilità; tuttavia, non viene usata mai da sola, infatti, il biopolimero presenta scarse proprietà meccaniche (Ahmady & Samah, 2021; Rajzer et al., 2014);

inoltre la sua degradazione è molto rapida; quindi, da sola non può fornire il corretto supporto per una coltura cellulare (Ahmady & Samah, 2021; Campiglio et al., 2019; Rajzer et al., 2014).
La gelatina può essere ricavata da diverse fonti animali (es. la gelatina suina, bovina, quella del pesce) e l'età dell'animale ed il tipo di collagene da cui è ricavata ne influenzeranno le proprietà (Ahmady & Samah, 2021; Campiglio et al., 2019).
In particolare, è possibile distinguere fra due tipologie di gelatina:

- Type A : ricavata pretrattando il collagene suino in soluzioni acide, e il cui punto isoelettrico è 8-9 quindi avrà carica positiva a PH fisiologico (Ahmady & Samah, 2021; Campiglio et al., 2019).

- Type B : ricavata pretrattando il collagene bovino in soluzioni alcaline ed il cui punto isoelettrico è 4-5, quindi avrà carica negativa a PH fisiologico (Ahmady & Samah, 2021; Campiglio et al., 2019).

Dopo il pretrattamento del collagene, seguono vari step (immersione in soluzioni acide o basiche, e processo di recupero diviso in diverse fasi, tra cui filtrazione, evaporazione, essiccazione, macinazione e setacciatura) (Campiglio et al., 2019).
Alla fine del processo, si otterrà la polvere di gelatina Type A o Type B (Campiglio et al., 2019).
La gelatina è termosensibile, infatti è in grado di compiere una transizione sol-Gel reversibile in acqua, nello specifico a temperature inferiori ai 20°C-30°C gelifica, mentre al disopra è in forma liquida (sol). Questo comportamento è dovuto al fatto che a basse temperature la gelatina tende a ripristinare la struttura a tripla elica del collagene mentre ad alte temperature è favorita una struttura più caotica di tipo random coil (Campiglio et al., 2019).

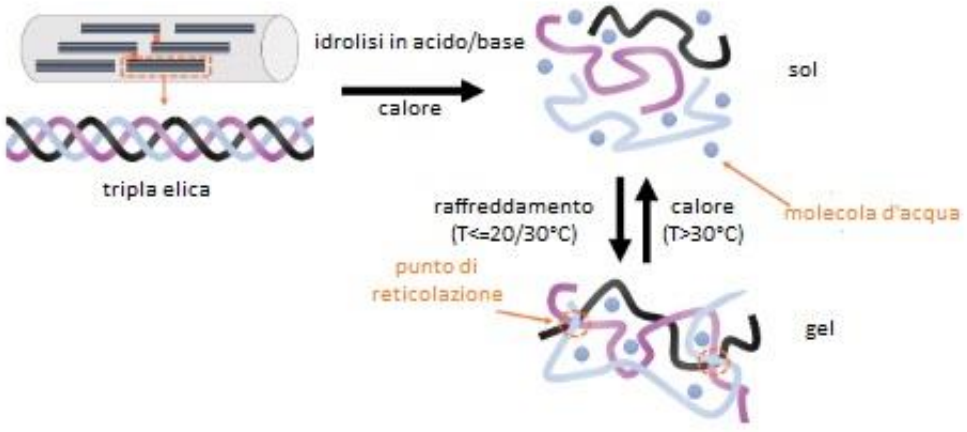


Figura 18: dal collagene alla gelatina e transizione sol-gel

Nel nostro studio è stata utilizzata una gelatina Type A (ottenuta da pelle suina) fornita dall'azienda Sigma-Aldrich (cod. 1002280682) in forma di polvere e con una solubilità di 50 mg/mL in H_2O.

2.1.3 γ-GLICIDOSSIPROPILTRIMETOSSISILANO (GPTMS)

Il GPTMS è un organosilano biocompatibile la cui struttura molecolare è riportata in figura 18.
Il GPTMS viene utilizzato anche come agente reticolante per il crosslinking della gelatina, applicandolo, prima del processo di fabbricazione di uno scaffold o membrana, alla soluzione contenente il biopolimero (Tonda-Turo et al., 2013), garantendo così una resa ottima nella realizzazione di fibre e scaffold a base di GL (Lapomarda et al., 2021; Tonda-Turo et al., 2013).
Nell'elettro filatura delle fibre di gelatina, oltre al GPTMS, sono già stati utilizzati anche alcuni solventi organici con buoni risultati (Tonda-Turo et al., 2013).
Tuttavia, a volte è stato visto che questi comportavano una denaturazione del biopolimero, oppure i solventi non evaporavano del tutto rischiando di avere effetti tossici sulle cellule o *in vivo* (Tonda-Turo et al., 2013).

Le fibre di gelatina sono stabili in ambiente fisiologico e/o *in vitro* solo se il biopolimero viene reticolato, ed i metodi tradizionali di crosslinking richiedono uno step di post-processing delle fibre in ambiente acquoso che potrebbe denaturarle oppure scioglierle del tutto (Lapomarda et al., 2021; Tonda-Turo et al., 2013).
Esistono anche dei metodi di crosslinking della GL che non richiedono un post-trattamento d'incubazione (raggi UV, trattamenti termici) ma che non hanno un'ottima resa in termini di reticolazione (Ahmady & Samah, 2021; Tonda-Turo et al., 2013).
In letteratura è stato evidenziato come uno step di crosslinking prima dell'elettro filatura, come avviene con il GPTMS, consente di ottenere un maggiore rendimento nella reticolazione della GL (Lapomarda et al., 2021; Tonda-Turo et al., 2013).

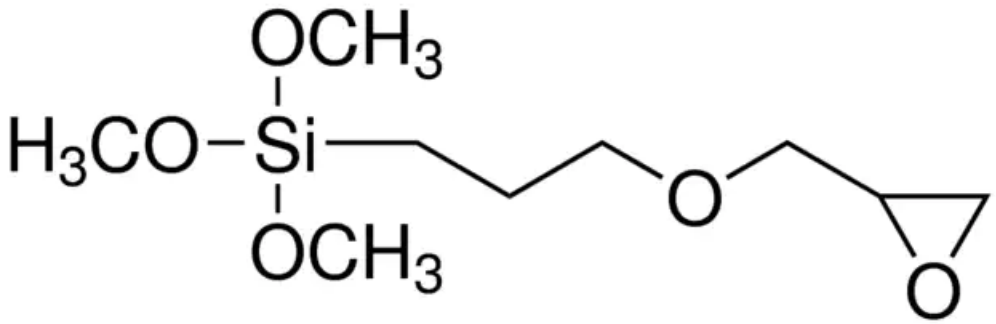


Figura 19: struttura molecolare del GPTMS

La reazione di reticolazione della GL con il GPTMS avviene in due fasi: la prima dove il GPTMS si lega con la GL, in una reazione in cui gli anelli di ossido di etilene del GPTMS reagiscono con gli amminogruppi della GL, e i gruppi trimetossilici del GPTMS subiscono un'idrolisi catalizzata da acido (fig. 19), generando gruppi silano (Si-OH) pendenti (Tonda-Turo et al., 2013); nella seconda fase si ha una reazione di condensazione durante l'evaporazione del solvente, nella quale gli Si-OH formano legami covalenti inter-catena Si-O-Si (fig. 20).

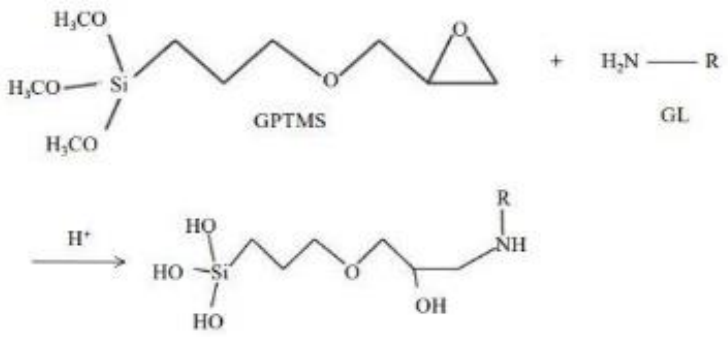


Figura 20: reazione d'idrolisi catalizzata da acido

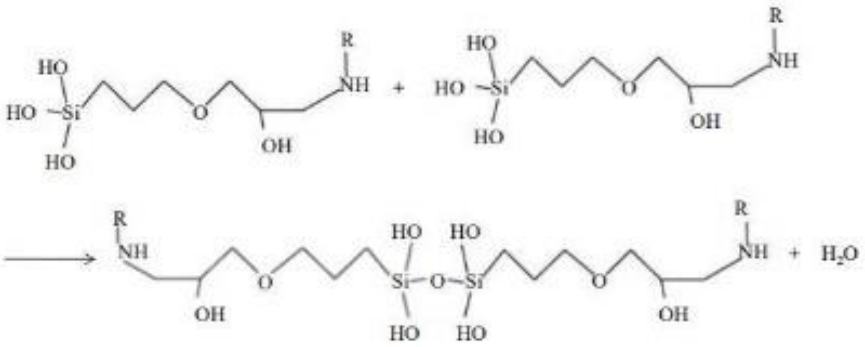


Figura 21: crosslinking della GL

Il GPTMS migliora le proprietà di reticolazione della GL e ne aumenta la stabilità in ambiente fisiologico, come dimostrato nello studio di Lapomarda et al., in cui il GPTMS è stato utilizzato come reticolante della GL poi co-polimerizzata con la pectina per realizzare un inchiostro di biomateriale per scaffold, ottenendo una miscela polimerica dalle ottime proprietà reologiche e con ottima resa di stampa senza necessità di alcun post-processing che potrebbe andare ad alterare la fedeltà delle strutture stampate (Lapomarda et al., 2021).
Nello studio svolto da Tonda-Turo et al. (Tonda-Turo et al., 2011) è stato confrontato il GPTMS con la genepina, largamente utilizzata nella realizzazione di scaffold e membrane a base di GL. Dalo studio è merso che entrambi sono ottimi in termini di resa della reticolazione; tuttavia, il GPTMS in acqua e quindi verosimilmente in

coltura ed *in vivo* presenta un maggiore stabilità grazie alla natura idrofobica dei suoi gruppi silossano (Si-O-Si), in più la reticolazione ha aumentato anche la stabilità termica della GL (Tonda-Turo et al., 2011).
Il GPTMS utilizzato nel nostro lavoro ci è stato fornito dall'azienda Sigma-Aldrich.

2.1.4 POLI- ε -CAPROLATTONE (PCL)

Il poli- ε -caprolattone (PCL) è un poliestere alifatico composto da unità ripetute di $C_6H_{10}O_2$, ed il suo peso molecolare può variare fra 530 e 640.000 Dalton (Rajzer et al., 2014; Siddiqui et al., 2018); per sintetizzare il PCL viene utilizzata la polimerizzazione per apertura dell'anello (ROP) di ε-caprolattone (ε-CL) catalizzata da una lipasi; il processo è illustrato in figura 21 (Siddiqui et al., 2018; Y. Zhang et al., 2018).

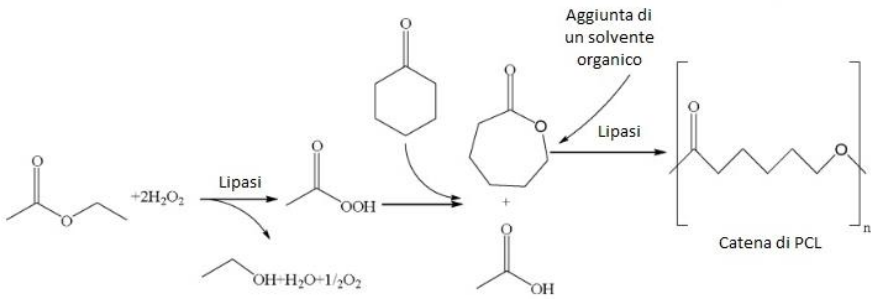


Figura 22: processo di polimerizzazione per apertura dell'anello di ε-caprolattone

Il PCL grazie alle sue lunghe catene alifatiche ha un'ottima stabilità termica, il suo punto di fusione è fra 59 e 64 °C ed ha una temperatura di transizione vetrosa di circa -60 °C (Siddiqui et al., 2018).
A temperatura ambiente il PCL è solubile in vari solventi organici (es. cloroformio) ma non è solubile in acqua (Siddiqui et al., 2018).
Il PCL è biodegradabile e biocompatibile e con ottime proprietà meccaniche ed è chimicamente inerte, caratteristiche che ne hanno ampliato l'utilizzo nell'ambito della bioingegneria (Rajzer et al., 2014; Siddiqui et al., 2018).
Tuttavia, la sua natura idrofobica ne riduce molto la tensione superficiale e quindi abbassa la sua interazione con i fluidi biologici, ostacolando l'adesione delle cellule (Rajzer et al., 2014).
Inoltre, il PCL ha un tasso di degradazione molto lento e questo, in base al tipo di applicazione, va ad influenzare eventuali fenomeni di rilascio di sostanze (come

farmaci) che ha volte devono essere rilasciati a piccole dosi e in tempi lunghi (Siddiqui et al., 2018) ; tuttavia, spesso si preferisce avere un tasso di degradazione più alto al fine di favorire la sostituzione del materiale impiantato con tessuto biologico, per cui il materiale non degradato potrebbe essere un ostacolo (Siddiqui et al., 2018); tale caratteristica è legata al fatto che il polimero presenta come monomero di catena cinque gruppi CH_2 (Siddiqui et al., 2018).
Realizzando una miscela fra il PCL e la GL si potrebbe ottenere un ottimo compromesso fra proprietà meccaniche ed interazione con fluidi e cellule, favorendo la loro adesione grazie a due fattori: le giuste proprietà meccaniche fornite dal PCL e la sequenza RGD della gelatina che viene riconosciuta naturalmente dalle cellule come target di adesione (Hivechi et al., 2021; Rajzer et al., 2014). Quindi la copolimerizzazione di questi due polimeri fornisce la giusta combinazione di proprietà meccaniche e biologiche per lo scopo di questa tesi.
Il PCL che è stato utilizzato nel nostro studio ci è stato fornito dall'azienda Sigma-Aldrich (cod. 1002280682), le sue proprietà sono elencate di seguito:

- Forma: granuli
- Peso molecolare: 80.000
- Impurità: <0.5 %
- Densità: 1.145 g/mL a 25°C

2.1.5 FALLOIDINA

La falloidina è un polipeptide di sette amminoacidi che deriva dal fungo velenoso *Amanita phalloides,* che forma legami specifici con l'F-actina delle cellule andando ad ostacolare la depolimerizzazione della proteina (Mazloom-Farsibaf et al., 2021; Wulf & Debohen, n.d.). La marcatura con falloidina è limitata a cellule fissate a causa della sua tossicità; tuttavia, viene largamente utilizzata nello staining dei citoscheletri, dato il suo basso costo e la sua affidabilità (86). La falloidina da noi utilizzata ci è stata fornita dall'azienda BioLegend.

2.1.6 4'-6-DIAMIDIN2-FENILDOLO

Il 4',6-diamidin-2-fenildolo noto come DAPI è un colorante organico che si lega con i nuclei delle cellule, formando complessi ad alta affinità con le regioni ricche di sequenze A-T[26] del DNA (Chazotte, 2011; Kapuscinski, 1995). Prima della marcatura le cellule devono essere prima fissate e la loro membrana deve essere resa permeabile al fine di raggiungere il materiale genetico (Chazotte, 2011). L'osservazione può essere svolta al semplice microscopio eccitando il DAPI con la luce ultravioletta affinché esse emetta con una lunghezza d'onda di 460-461 nm (blu) (Crowley et al., 2016). Il DAPI che abbiamo utilizzato è stato acquistato dalla compagnia Invitrogen.

2.2 METODI

2.2.1 CURVA DI CALIBRAZIONE DEL LivePa

La prima fase di questo lavoro di tesi ha previsto una preliminare caratterizzazione del sistema pressorio, effettuata utilizzando una membrana porosa commerciale in PET all'interno del bioreattore per separare le due camere.

2.2.1.1 SET UP BIOREATTORE E MODALITÁ DI MISURA DELLA PRESSIONE

Il sistema è stato utilizzato con configurazione liquido-liquido, ossia, liquido sia in camera apicale che basale, e come fluido è stata utilizzata dell'acqua. Al fine di mimare le condizioni sperimentali, la caratterizzazione è stata effettuata all'interno di un incubatore, in condizioni ambientali controllate (temperatura di 37°C e 5% di CO_2). Questo studio preliminare aveva lo scopo di monitorare l'incremento pressorio generato dall'occlusione dei tubi in uscita, prima in camera basale e poi

[26] A-T: sequenza delle basi azotate Adenina-Timina legate fra loro in maniera specifica secondo la teoria della complementarità delle basi di Watson e Crick.

in camera apicale così da prevedere lo stress che si andrà poi ad esercitare sulle cellule.
Per prima cosa è stato individuato un set up ottimale del sistema, da cui partire con la costruzione della curva di calibrazione del LivePa.
Più precisamente, è stata cercata una geometria di sistema ottimale, dalla quale ottenere misure della pressione in camera in maniera ripetibile ed affidabile.
Per quanto riguarda il montaggio del sistema, dapprima, il bioreattore è stato assemblato in tutte le sue parti, poi è stato riempito prima a livello della camera basale e poi di quella apicale. Una volta riempito il bioreattore si è passati al riempimento del circuito fluidico tramite l'utilizzo della pompa peristaltica, al fine di minimizzare il rientro di aria nel bioreattore. Una volta collegato il LiveBox2 al circuito, il sensore di pressione è stato collegato al sistema per iniziare le misure. In particolare, si è proceduto prima con le misure in camera basale e poi in apicale.
La caratterizzazione sul bioreattore LB2 riempito solo con acqua ha l'obiettivo di quantificare l'incremento pressorio a passi incrementali diversi esercitati esternamente con il LivePa; andando ad incrementare gradualmente la strizione del tubo di uscita dalla camera del bioreattore analizzata.

2.2.1.2 RACCOLTA DEI DATI

Il lavoro prevedeva l'acquisizione di tre tipologie di misure:

- Statico: valutazione del contributo pressorio della sola acqua presente nel sistema; la misura è stata effettuata con LiveFlow e LivePA spenti, ma circuito interamente collegato, così da registrare l'inerzia del sistema.

- Controllo: valutazione del contributo pressorio della LiveFlow; la misura è stata acquisita durante l'azione della sola pompa.

- Acquisizione: valutazione del contributo pressorio del LivePa; la misura è stata effettuata con il LivePA e la pompa contemporaneamente in funzione.

Per standardizzare il metodo di analisi, al fine di ottenere un'acquisizione completa, sono stati eseguiti, in maniera sistematica, degli step temporali di misura nell'ordine seguente:

1) Statico per 30 minuti.

2) Controllo per 30 minuti.

3) Acquisizione per un'ora.

4) Controllo per 20 minuti.

Le misure sono state fatte mediante il sensore PX409-USBH.476924 OMEGA™ © (Spectris 2022) e in seguito analizzate tramite i programmi Excel © Microsoft 2022, per quanto riguarda la costruzione di un dataset, e Matlab © (1994-2022 The MathWorks, Inc.), per il post-processing dei dataset.
I dati sono stati acquisiti per due flussi, 100 μL/min e 200 μL/min, a quattro diversi passi incrementali 2,3,5,6 che sono quattro posizioni del pistone del LivePa, di cui ne descrivono l'intero spostamento verso il tubo, da un primo contatto fino al suo quasi completo schiacciamento

Alla fine di ogni processo di misura è stato calcolato il valore del rapporto incrementale con la seguente formula:

$$r = \frac{P_{incr} - P_{statico}}{P_{controllo} - P_{statico}}$$

Dove:

- r= rapporto incrementale.

- P_{incr}= la pressione media misurata nella camera con flusso acceso e passo incrementale settato sul LivePa.

- $P_{controllo}$ = media delle pressioni medie misurate nella camera con solo la LiveFlow acceso, quindi il contributo della peristalsi della pompa nei due controlli.

- $P_{statico}$= pressione media monitorata nella camera senza azione né del flusso né del passo incrementale.

Questo valore è un indice di quante volte aumenta la pressione nella camera osservata rispetto al controllo. Il valore che si ricava di *r* viene epurato da tutti gli effetti di flusso ed inerzia del sistema per osservare esclusivamente l'effetto della strizione.

Una volta completate le misure, tramite il fitting tool di Matlab © è stata costruita la retta di calibrazione del LivePA ponendo in ascissa i passi incrementali ed in ordinata i rapporti incrementali misurati. Il software ha permesso di calcolare tutti i coefficienti della curva la cui equazione è la medesima per entrambi i flussi utilizzati e per entrambe le camere:

- Flussi 100 µL/min e 200 µL/min

- Equazione utilizzata: $f(x) = a_0 * e^{(a_1 * x)} + a_2 * e^{(a_3 * x)}$+c

In cui f(x) rappresenta l'andamento del rapporto incrementale in funzione del passo incrementale applicato (in x).

2.2.1.3 MISURAZONI IN CAMERA BASALE

Il set up del sistema è stato eseguito nel seguente modo: per pima cosa è stato inserito nella base del clamp system la camera basale del LiveBox2, opportunamente dotato di un tubo di uscita da connettere al sensore per la misurazione della pressione. Poi, è stato montato l'holder con la membrana già innestata.

Figura 23: membrana innestata sull'holder

Successivamente è stata alloggiata la camera apicale, sulla quale sono stati inseriti vetrino e *Top*. Il sistema è stato chiuso utilizzando un *low friction ring* in delrin e serrato tramite l'*s-shape* del clamp system.

Figura 24: set up per le misure in camera basale con la membrana commerciale

Il riempimento è stato eseguito con una siringa Luer Lock, andando a mettere 10 mL di acqua nella mixing chamber del circuito basale e 10 mL di acqua nel reservoir di quello apicale. Poi, sono stati riempiti i due compartimenti del bioreattore, l'acqua utilizzata in questo passo è stata prelevata dai rispettivi reservoir. Il tubo di connessione fra sensore e bioreattore è stato riempito in seguito utilizzando una siringa.
Poi, sono state eseguite le misure come descritto in precedenza. In questo caso lavorando con il LivePa sul tubo in uscita dalla camera basale.

2.2.1.4 MISURAZIONI IN CAMERA APICALE

Per procedere con le misure in camera apicale è stato modificato il set up del sistema, andando ad inserire nella base del clamp system la camera basale con vetrino sul fondo. Sono stati alloggiati l'holder e la membrana, e poi è stata montata la camera superiore.
Questa volta il vetrino è stato sostituito con un *top* della camera apicale modificato, dotato di un tubo di uscita da connettere al sensore. In fine, è stato chiuso tramite il low-friction ring e la s-shape del clamp system. Il riempimento è stato svolto in maniera analoga a quanto fatto per le misurazioni in camera basale.

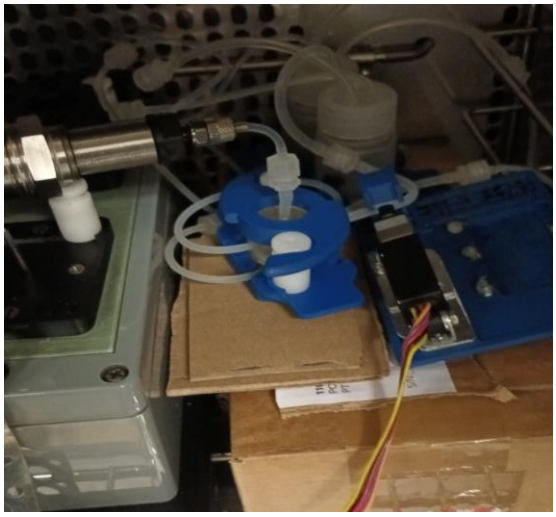


Figura 25: set up per le misure in camera apicale con la membrana commerciale

Le misure sono state acquisite seguendo lo step di misure su detto, andando però a comprimere l'uscita apicale.

2.2.2 ELETTROSPINNING

L'elettrospinning è una tecnica di fabbricazione con la quale si possono realizzare scaffold e membrane nano fibrosi (Garg K & Bowlin G, 2011; Gautam et al., 2013). La tecnica consiste nell'estrusione di una soluzione polimerica attraverso una guida elettrostatica su un substrato (Garg K & Bowlin G, 2011).
Il set up più semplice prevede una siringa carica di soluzione polimerica, un collettore metallico ed un generatore di alta tensione (Garg K & Bowlin G, 2011). La soluzione da estrudere è composta da un polimero disciolto in un solvente (electrospinning solution), mentre il collettore metallico può avere diverse forme in base alle caratteristiche geometriche dello scaffold che si vuole realizzare (Garg K & Bowlin G, 2011).
Nello specifico, il flusso della soluzione verso il collettore è governato da una differenza di potenziale che viene instaurata fra l'ago della siringa ed il collettore (Garg K & Bowlin G, 2011; Gautam et al., 2013). Per prima cosa si crea una goccia di soluzione sulla punta dell'estrusore che sarà trattenuta dalla propria tensione superficiale (Gautam et al., 2013), poi grazie all'effetto del campo elettrico, la goccia si carica (Garg K & Bowlin G, 2011; Gautam et al., 2013).

Su di essa andranno così ad agire due tipi di forze elettrostatiche: la repulsione reciproca fra cariche dello stesso segno sulla sua superficie e le forze Coulombiane dovute al campo esterno (Garg K & Bowlin G, 2011). A causa di questi due effetti la goccia si allunga andando a formare il **cono di Taylor** (Garg K & Bowlin G, 2011; Gautam et al., 2013). Quando il campo elettrico sarà sufficientemente intenso, vincerà la tensione superficiale della soluzione che verrà quindi estrusa forzatamente dalla punta del cono (Garg K & Bowlin G, 2011; Gautam et al., 2013). Prima di raggiungere il collettore il solvente evaporerà e si formeranno delle fibre nanometriche orientate casualmente (Garg K & Bowlin G, 2011; Gautam et al., 2013).
Nella "fase di volo" dall'estrusore al collettore si possono osservare tre frazioni distinte: all'inizio si ha un'estrusione delle fibre in modo costante e lineare di un **getto primario**, poi questo entra in una fase chiamata **zona d'instabilità**, in cui il flusso della soluzione assume traiettorie circolari o ad elica, poi a mano a mano che ci si avvicina al collettore, l'instabilità aumenta portando ad una traiettoria completamente casuale detta **zona del getto** (Garg K & Bowlin G, 2011). Nella zona del getto l'orientamento casuale si crea a causa del fatto che nella zona d'instabilità il getto primario cambia forma ed in più evapora il solvente e ciò altera il bilancio fra la tensione superficiale, la densità di carica ed il campo elettrico esterno; quindi, per compensare questo squilibrio di cariche il getto primario si scinde in getti più piccoli che poi si depositeranno sul collettore (Garg K & Bowlin G, 2011; Gautam et al., 2013). La resa della tecnica dipende da diversi parametri, riportati nella tabella sottostante (Garg K & Bowlin G, 2011):

Parametri del sistema	• Proprietà della soluzione (concentrazione del polimero, tensione superficiale, conduttività). • Proprietà del polimero (peso molecolare, struttura).
Parametri di processo	• Voltaggio applicato. • Flusso imposto. • Distanza punta-collettore. • Parametri ambientali (es. temperatura, umidità). • Movimentazione o meno del substrato di raccolta.

Tabella 1: parametri che influenzano la resa dell'elettrospinning

La riuscita della produzione delle fibre non può essere sempre assicurata ed alcuni difetti si possono presentare. I più comuni sono di tipo:

- Beads: sono delle vere e proprie perline che si formano sulle fibre a causa di una scarsa evaporazione del solvente.

- Nastri: fibre in cui il solvente è ancora abbondante e quindi per il loro peso collassano e perdono la tradizionale forma cilindrica.

- Difetti superficiali: sono piccole imperfezioni sulle superfici delle fibre.

Per minimizzare la probabilità di avere difetti sulle fibre elettro filate bisogna aggiustare in modo accurato i parametri del sistema e di processo.

2.2.2.1 PROCESSO DI ELECTROSPINNING DELLA MEMBRANA IN PCL-GL

Nel nostro studio il sistema do estrusione adottato per le membrane in PCL-GL è la 3D Elettro spinning Tools della Nova Spider © 2022, (Sydney). Il sistema è composto da una siringa posta orizzontalmente con un ugello metallico a cui è stato collegato un tubo in silicone, che poi arrivava verticalmente ad un collettore piano, sul quale è stato posto un foglio di alluminio (Kidoaki et al., 2005; Zavan et al., 2021). I parametri di processo utilizzati sono i seguenti:

- Tensione (ΔV) fra ugello e collettore: 20 kV.

- Distanza fra collettore ed ugello (d): 12 cm.

- Volume della siringa ($V_{siringa}$): 5 mL.

- Flusso di estrusione ($Q_{estrusione}$): 500 µL/h.

La soluzione polimerica è stata preparata al fine di avere un rapporto PCL/GL 80:20 che è stato visto essere ottimale dal punto di vista meccanico e adesione cellulare (Xue et al., 2015).
La preparazione della soluzione è stata eseguita adottando il seguente protocollo: la gelatina ed il PCL sono stati dispersi in una soluzione a base di acido acetico (Sigma-Aldrich) ed acido formico (Sigma-Aldrich) (Feng et al., 2012; Gautam et al., 2013), ottenendo una miscela al 15% [w/v] (Giuntoli et al., 2021).
Il sistema è stato poi posto in agitazione per una notte in una stirring flask sotto cappa, il tempo di agitazione è stato ottimizzato al fine di ottenere strutture stabili (Gil-Castell et al., 2020); infatti, è stato dimostrato che mantenere la miscela in soluzione per più di 24h/48h porta ad avere costrutti molto labili (Gil-Castell et al., 2020).
Dopo 24h è stato aggiunto il reticolante GPTMS (Lapomarda et al., 2021; Tonda-Turo et al., 2013) in concentrazione 3,68% (v/v) e la soluzione è stata posta in agitazione per 30 minuti (Giuntoli et al., 2021; Reyes-Peces et al., 2020); la soluzione è stata quindi caricata all'interno di una siringa ed è stato eseguito il processo di elettro filatura.

2.2.3 CARATTERIZZAZIONE DELLE MEMBRNA IN PCL/GL

Date le diverse caratteristiche della nostra membrana rispetto a quella commerciale in PET, sono state eseguite delle analisi su alcune sue caratteristiche per prevedere il suo comportamento all'interno e del sistema LiveBox2 con e senza cellule.

2.2.3.1 ANALISI DI PERMEABILITÁ

La permeabilità è una caratteristica molto importante per una membrana sulla quale si dovrà poi fare coltura cellulare, in quanto valuta, se una membrana permette il passaggio o meno un liquido o soluti. Nel nostro caso il passaggio deve essere minimo in quanto, come accade a livello fisiologico, il liquido non deve passare dalla zona basale (endotelio) a quella apicale (epitelio) attraverso la membrana, ma sarà mediato soltanto dallo strato di cellule a confluenza che si andrà a formare (Higuita-Castro N et al., 2017), ad esempio, infatti, per le proteine, maggiore è il oro peso molecolare e più la barriera si fa selettiva e ne impedisce il

passaggio a meno di fenomeni mediati da recettori (Bhattacharya & Matthay, 2013).
Per stimare le proprietà di barriera della nostra membrana è stato eseguito un test di passaggio con fluorodestrano (FD) da 70 kDa disciolto in PBS (Higuita-Castro N et al., 2017).
Nello specifico, sono stati realizzati tre campioni di soluzione di FD in PBS a concentrazione 1 mg/mL e tre membrane in PCL/GL di sezione 1.2 cm^2.
Poi sono state preparate tre transwell e nella zona basale è stato posto del PBS puro, nell'intermezzo la membrana ed in apicale la soluzione campione di FD e PBS (1 mg/mL), e è stato incubato il tutto per un'ora (Higuita-Castro N et al., 2017).
Nel mentre, in una multiwell, sono state preparati dei campioni di FD in PBS in triplicato a concentrazioni decrescenti (1 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.125 mg/mL, 0.0625 mg/mL, 0.03125 mg/mL, 0.0156 mg/mL, 0.008 mg/mL e PBS puro). Questi campioni sono stati utilizzati per costruire una retta di calibrazione che mettesse in relazione la concentrazione del FD con l'intensità di fluorescenza (Higuita-Castro N et al., 2017).
Infatti, tramite uno spettrofotometro è stata valutata l'emissione dei campioni di riferimento e quelli delle camere basali delle tre transwell (Higuita-Castro N et al., 2017).
Per ogni concentrazione sono stati così ottenuti tre valori di fluorescenza, di cui è stata calcolata la media ed è stata costruita le retta di calibrazione (fig. 25), tramite Microsoft Office Excel 2022 (Microsoft):

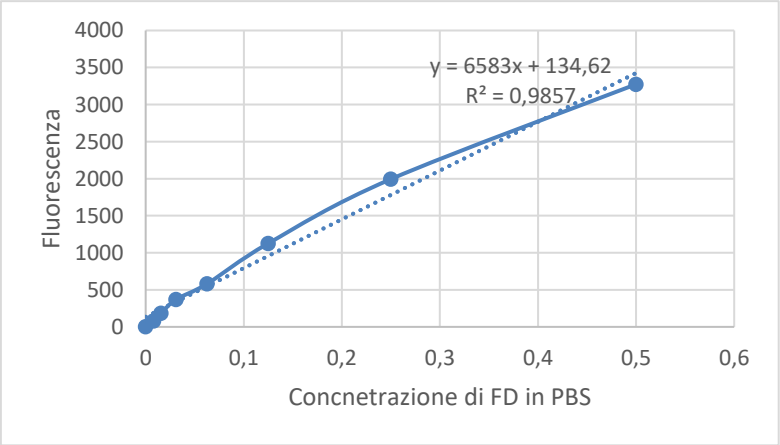


Figura 26: retta di calibrazione dei campioni FD in PBS

Il grafico presenta in ascissa i valori di concentrazione e sulle ordinate i valori di emissione, in più in alto è riportata l'equazione della retta di calibrazione.
Per prima cosa sono stati monitorati i valori di fluorescenza dei compartimenti basali delle tre tranwell campione; poi, invertendo l'equazione della retta di

calibrazione è stata ricavata la concentrazione di FD che dall'inserto apicale era passato in quello basale attraverso la membrana (Higuita-Castro N et al., 2017). Quindi, è stata calcolata la permeabilità apparente dalla seguente relazione (Higuita-Castro N et al., 2017):

$$P_{app} = \frac{C}{A * T * C_0}$$

Dove:

- P_{app}: è la permeabilità apparente della membrana.
- C: concentrazione del FD in camera basale [mg/mL].
- A: sezione della membrana [cm^2].
- T: tempo d'osservazione (3600 secondi).
- C_0: concertazione di FD in camera apicale (1 mg/mL).

Poi, è stato eseguito un ulteriore test di permeabilità della membrana elettro filata in PCL/GL, per valutare eventuali problemi di perfusione di acqua dalla camera basale a quella apicale.
Nello specifico è stato fatto un test di sovrapressione idraulica in statico.
Per svolgere questa prova sono state prese due bijoux. In una è stata messa dell'acqua e poi è stata posta la membrana sulla sua apertura superiore. L'altra è stata connessa alla prima bijoux con del parafilm, in maniera tale da avere sotto la bijuox con l'acqua e sopra quella vuota e fra di esse la membrana. Poi, il sistema è stato capovolto e tenuto sotto osservazione per circa 2-3 ore. Alla fine, è stato monitorato l'eventuale passaggio di liquido attraverso la membrana.

2.2.3.2 TEST DI DEGRADAZIONE DELLA MEMBRANA IN PCL/GL

Al fine di valutare il mantenimento delle proprietà della membrana in ambiente acquoso e sotto flusso, è stato eseguito un test di degradazione della membrana in PCL/GL in acqua.
Il LiveBox2 è stato riempito, poi, è stata collegata la camera con il circuito fluidico e alla Live flow, impostata a 200 μL/min.
Per valutare l'eventuale rilascio di particolato, sono stati fissati due time points:

- T_0: giorno in cui la membrana è stata inserita nel circuito.

- T_1: fissato a sette giorni dall'inserimento della membrana nel circuito.

Successivamente la membrana è stata osservata in microscopia a scansione elettronica (SEM).

2.2.3.3 CARATTERIZZAZIONE DELLA DEFORMAZIONE DELLA MEMBRANA IN LB2

Per analizzare il comportamento della membrana in PCL/GL all'interno del LB2 sottoposta ad aumento di pressione, sono stati realizzati dei campioni circolari di membrane elettro filate. Sono stati identificati dei punti lungo il perimetro di circonferenze concentriche dal diametro di 12 mm e 6 mm, poi, è stata marcata la membrana con del colorante rosso.
In seguito, il bioreattore, equipaggiato con la membrana, è stato inserito nel circuito fluidico. Sono state acquisite delle sequenze video in interfaccia liquido-liquido e prendendo dei fotogrammi in condizioni statiche, con solo flusso e in condizione attuata.
I passi testati sono stati il 2, il 3 ed il 5 e solo in camera basale, mentre il flusso di lavoro scelto è stato 200 μL/min. I fotogrammi acquisiti sono poi stati analizzati con il software ImageJ (National Institutes of Health, USA)(Schneider et al., 2012), al fine di monitorare spostamenti nelle tre direzioni (x, y, z), della membrana in PCL/GL. Le riprese sono state fatte dall'alto e laterali; la marcatura in rosso della membrana ha aiutato in quest'ultimo caso per migliorare la sua visibilità attraverso il silicone della camera. Le immagini dall'alto sono state analizzate con la macro di ImageJ Analise Particles con la quale sono state calcolate le aree dei puntini marcati nei vari casi di controllo, passi incrementali 2,3 e 5. Per valutare la deformazione sono state valutate le differenze di aree punto a punto fra i singoli passi ed il controllo. Successivamente, sono state eseguite delle misure in camera basale con le stesse modalità di lavoro seguite con la membrana in PET. Tuttavia, dati i risultati in corso d'opera, si è deciso di andare ad acquisire i passi 5, 6 e 7, che la contrario di quanto osservato con la membrana commerciale, non portavano ad un aumento netto di pressione. I risultati verranno discussi e analizzati nel dettaglio nei capitoli successivi.

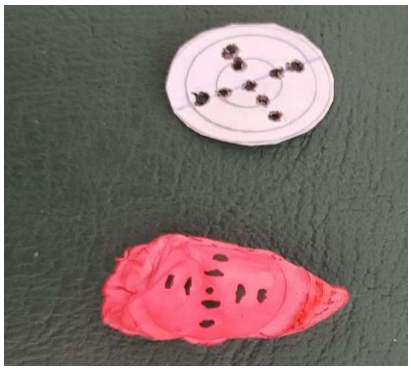


Figura 27: maschera per disegnare i puntini in alto e membrana in PCL/G marcata in rosso (in basso)

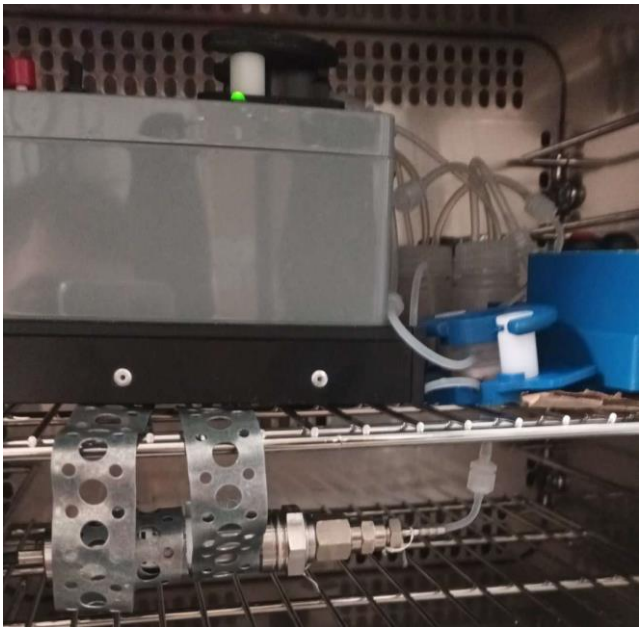


Figura 28: set up per le acquisizioni in camera basale con la membrana in PCL/GL

2.2.4 ANALISI STATISTICA

Per avere un dataset di misure statisticamente valido e per verificare la ripetibilità delle acquisizioni sono state realizzate delle popolazioni da tre misure ciascuna per ogni passo incrementale applicato.
Precisamente, con la membrana in PET, sono state acqiisite dodici misure (tre per ciascuno dei passi applicati) con ogni flusso attuato in ciascuna camera (100 e 200 μL/min), per un totale di 24 misure in camera basale; lo stesso è stato fatto con la camera apicale.
In modo analogo sono state svolte le misure in camera basale con la membrana in PCL/GL, con la quale però è stato preso un passo in meno ed è stato scelto il flusso 200 μL/min (condizione di lavoro utilizzata con la coltura cellulare), prendendo in totale 9 rapporti incrementali.
Poi è stata eseguita l'analisi statistica con l'Ordinary one-way ANOVA test.

2.2.5 SEMINA CELLULARE

I test cellulari sono stati effettuati utilizzando due differenti linee di cellule: per la camera apicale le A549 (ATCC), cellule tumorali dell'epitelio basale umano, mentre per la camera basale le HULEC-5 A (ATCC) cellule endoteliali polmonari umane. In questo modo si è cercato di riprodurre l'endotelio vascolare nella zona basale della membrana e l'epitelio polmonare in quella apicale.
Lo studio ha previsto tre esperimenti, al fine di osservare il comportamento delle cellule in tre condizioni diverse ossia: statico, controllo ed attuato a passo incrementale 6; il primo è stato svolto in due Transwell mentre quelli in dinamico in due diversi LB2.
Per prima cosa le camere LB sono state sterilizzate in autoclave (121°C per 20 minuti); contemporaneamente, sono state preparate quattro membrane in PCL/GL, due per lo studio in statico e due per quelli in dinamico. Finito il ciclo di sterilizzazione, due membrane sono state montate su due differenti holder, poi, è stata preparata una soluzione in PBS e antibiotico-antimicotico. Le membrane campione sono state messe in dei pozzetti di una multiwell e immerse nella soluzione antibiotica per un'ora, trattate con i raggi UV: per i primi 30 minuti l'esposizione è stata fatta dal lato basale, poi le membrane sono state ribaltate ed esposte agli UV per i restanti 30 minuti dal lato apicale.
Successivamente i campioni sono stati sciacquati in PBS ed in fine sono state assemblate le due camerette e le due Transwell.

2.2.5.1 SEMINA DELLA CAMERA BASALE

Inizialmente sono state seminate le cellule HULEC-5a, previo mantenimento in coltura in due flask con il loro mezzo specifico composto, come indicato dal fornitore © ATCC, da Fetal Bovine Sierum (FBS) al 10 %, L-Glutammina (L-GLU) in 10 mM, antibiotico 1%, idrocortisone a 50 μg/mL, Epidermal Growth Factor (EGF) in concentrazione 10 ng/mL e DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium).
Dopo aver eseguito un lavaggio con PBS, le cellule sono state trattate con tripsina per indurre il distaccamento. Il tutto è stato messo in incubatore per tre minuti, necessari all'attivazione dell'enzima. Poi è stato aggiunto del mezzo per HULEC-5a ed è strato raccolto il volume di mezzo e cellule.
Successivamente è stata preparata una cameretta per conta cellulare composta da quattro quadranti, in cui è stata pipettata una goccia di mezzo e cellule ed è stata eseguita la conta delle HULEC-5a. Dal processo è stato ricavato il numero di cellule totali nel volume disponibile, con la seguente formula:

$$numero\ di\ cellule = \frac{numero\ di\ cellule\ contate * V * 10.000}{4}$$

In cui:

- Numero di cellule contate: sono le cellule risultate dalla conta
- V: volume totale di mezzo e cellule
- 10.000: fattore moltiplicativo
- 4: numero di quadranti della cameretta dove è stata fatta la conta, da cui si evince che il numero di cellule ottenuto è una stima media.

Poi, è stata calcolata l'area di semina disponibile per le cellule, ossia la sezione della membrana, che avendo un diametro di 7,5 mm ha messo a disposizione un'area di circa 1,8 cm^2; questo calcolo è stato utile per capire quante cellule sarebbero state necessarie per ogni camera basale, moltiplicando la sezione per la densità di semina cellulare.
Per ricavare le cellule totali necessarie è stato moltiplicato il numero ottenuto per quattro al fine di avere le cellule per le tre membrane a disposizione più una, al fine di mantenere un certo margine di sicurezza.
Per ricavare il volume contenente il numero di HULEC-5a necessarie alla semina della camera basale è stata utilizzata la seguente proporzione:

$$cellule\ totali : V\ totale\ di\ mezzo\ e\ cellule = cellule\ necessarie : V\ necessario$$

Quindi, sono stati prelevati gli mL necessari dal volume totale preparato e poi sono state isolate le cellule in esso contenute. Per isolare le cellule è stata fatta una centrifugazione da 8 minuti a 1000 rpm (giri per minuto) e poi è stato eliminato il mezzo surnatante con una falcon. In seguito, sono stati aggiunti 400 µL di mezzo alle cellule isolate, perché come indicato dall'azienda IVTech S.R.L., per la camera basale le cellule devono essere seminate con 100 µL di mezzo. Quindi, sono stati prelevati 100 µL di mezzo e cellule ed è stata eseguita la semina in ogni camera basale, e i tre LB2 sono stati lasciati in incubatore per 2 ore, dopo le quali è stato fatto un refill di mezzo in ciascuna camera ed è stato lasciato tutto a 37°C overnight.

2.2.5.2 SEMINA DELLA CAMEA APICALE

In camera apicale, come su detto, sono state seminate le cellule epiteliali della linea A549 fornite dall'azienda © ATCC. Come nel caso delle endoteliali le cellule sono state staccate dal terreno della flask in cui erano contenute. In particolare, le cellule A549 sono state staccate dal terreno di una flask piccola tramite un trattamento con tripsina per tre minuti in incubatore.
Passati i tre minuti di incubazione, la flask è stata tolta dall'incubatore e, sotto cappa, è stato aggiunto del mezzo per epiteliali.
Poi è stata eseguita la conta cellulare, come fatto per le HULEC-5a; ed è stato ricavato il numero totale di cellule nel volume disponibile.
Di nuovo, sfruttando la stessa proporzione del caso precedente è stato calcolato il volume necessario per seminare l'area a disposizione di una membrana a partire dalla densità di semina delle A549.
Poi, moltiplicando il risultato ottenuto per quattro, sono state ricavate le cellule necessarie per le tre camere più una, e da qui, come sopra, è stato ottenuto il volume necessario per prelevare questo numero di cellule.
Quindi il volume necessario è stato inserito in una falcon; poi, di nuovo, per isolare le cellule è stato centrifugato a 1000 rpm per 8 minuti ed è stato eliminato il mezzo surnatante e sono stati aggiunti 400 µL di mezzo per A549, in quanto il volume di semina per la camera apicale, come indicato dall'azienda IVTech S.R.L., è di 100 µL. Così per ciascuna camera sono stati prelevati 100 µL di mezzo ed A549 che, quindi, sono state seminate in camera apicale. Poi è stato tutto incubato per un'ora, al termine della quale è stato fatto un refill di mezzo e poi, di nuovo è stato posto il tutto in incubatore per 48 ore.

2.2.5.3 SEMINA DELLE CELLULE IN STATICO

Per lo studio in statico sono state preparate e sterilizzate due membrane in PCL/GL, che poi sono state inserite nell'inserto di due transwell. Dopo è stata fatta la semina delle cellule, seminando prima le HULEC-5a e poi le A549. Per quanto riguarda le cellule endoteliali si è proceduto con il distaccamento e l'isolamento delle cellule come fatto in precedenza. Sono state risospese in un volume di mezzo pari al volume dei comparti basali delle due transwell e ivi seminate. Dopo un'ora è stato fatto un refill di mezzo e, in fine, sono state mantenute in coltura per 24 h. Successivamente, sono state coltivate le cellule epiteliali; quindi, prima distaccate e poi isolate con centrifugazione, in seguito risospese in un volume di mezzo pari a quello del setto apicale delle transwell e sono state seminate nei due comparti apicali. Dopo due ore, è stato cambiato il mezzo e il sistema è stato lasciato in incubate per sette giorni.

2.2.6 STUDIO CON LE CELLULE ALL'INTERNO DELL'LB2

Lo studio in dinamico con le cellule è stato svolto mantenendole in coltura per una settimana, in due condizioni, un controllo ed un attuato con passo 6.
Per iniziare gli studi dinamici sono state sterilizzate in autoclave le teste del modulo LiveFlow e sono stati puliti con un panno imbevuto di etanolo entrambi i moduli LiveFlow e LivePa, così come anche i supporti per le mixing chambers da connettere al circuito.
Nello specifico, sono stati utilizzati quattro reservoirs, due per le camere apicali e due per quelle basali per i due LB2 necessari agli studi dinamici.
Per le analisi in dinamico sono stati riempiti i reservoirs basali con 10 mL di mezzo per HULEC-5a e quelli apicali con 10 mL di mezzo per A549. Poi, i tubi di pescaggio dei reservoirs sono stati collegati con quelli delle due teste della LiveFlow, utilizzando una testina per quelli basali e l'altra per quelli apicali, ed è stato acceso il modulo a 200 µL/min per 20 minuti al fine di riempire tutti i circuiti. Poi sono stati connessi i due LB2 ed è stato lasciato scorrere il mezzo di coltura per eliminare le bolle d'aria all'interno delle due camere. Una volta eliminate le bolle d'aria i due circuiti sono stati inseriti in incubatore a 37°C e 5% di CO_2, ed è stato chiuso il tubo di uscita basale di uno dei due LB2, è stato attuato il passo incrementale 6; per l'esperimento è stata accesa solo la testa pompante connessa alle camere basali mentre quella connessa ai circuiti apicali è stata lasciata spenta; in fine, i sistemi sono stati mantenuti così per una settimana all'interno dell'incubatore.

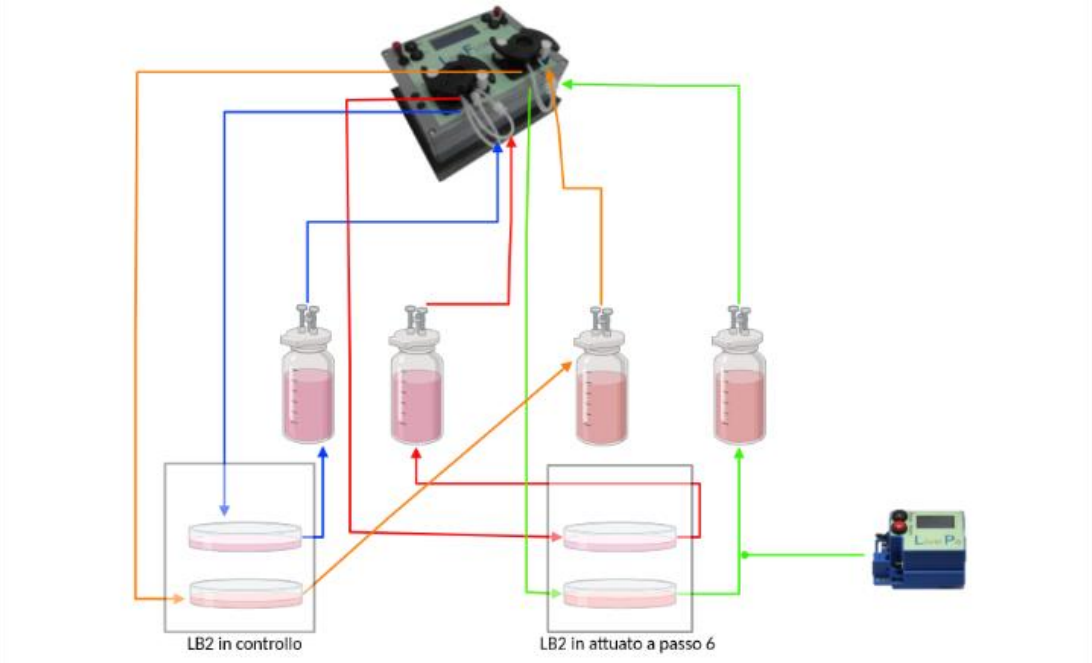


Figura 29: cartoon schematico del test effettuato con le cellule in controllo ed attuato. Created with BioRender.com

2.2.7 OSSERVAZIONE DELLE CELLULE

Per fare un'osservazione preliminare sull'adesione delle cellule sulla nostra membrana in PCL/GL, in entrambe le camere è stato fatto quanto spiegato qui di seguito.

2.7.1 PROTOCOLLO DI FISSAGGIO E MARCATURA DELLE CELLULE

Passati i sette giorni di sperimentazione, è stato tolto il mezzo dalle Transwell e dalle camerette dei LB2 ed è stato eseguito un lavaggio in PBS^{--}[27].
Successivamente sono state trattate le cellule per trenta minuti con Paraformaldeide (PAF, formalina) al 4% in PBS (Melan, 1994; Schnell et al., 2012). Poi,

[27] PBS^{--}: è una tipologia di PBS privato di calcio e magnesio e che non causa il distaccamento cellulare, a differenza del PBS^{++}, che, al contrario, è ricco di Ca e Mg e favorisce il distaccamento delle cellule.

è stato risciacquato il tutto con PBS facendolo agire per cinque minuti al fine di rimuovere la PAF in eccesso.
Successivamente per aumentare la permeabilità delle cellule è stato fatto un trattamento con Triton X 100, applicando una soluzione allo 0.5% di Triton X in PBS (Melan, 1994; Schnell et al., 2012).
Per il trattamento le membrane con le cellule sono state messe in quattro pozzetti di una multiwell con la soluzione di Triton X 100 sotto e sopra, al fine di trattare sia le cellule che erano in basale che quelle che erano in apicale; le membrane sono state incubate per 5 minuti, e poi è stato risciacquato tutto in PBS per rimuovere il Triton X 100 in eccesso.
Al passo successivo, è stata preparata una soluzione di Bovine Serum Albumine (BSA) all'1% in PBS ed è stata applicata alle membrane come fatto con il Triton X 100, però questa volta le membrane sono state incubate per un'ora.
Successivamente è stata preparata una soluzione di BSA e falloidina in rapporto 1:60 e i campioni sono stati incubati per quaranta minuti, facendola sempre agire sulle parti basale ed apicale della membrana.
Il passo successivo è stato quello di preparare la soluzione di DAPI. Come indicato dall'azienda Invitrogen, è stata preparata prima una soluzione madre composta da 2.1 µL di DAPI in 100 µL di PBS, e poi è stata preparata una soluzione di DAPI in PBS in rapporto 1:1000 ed è stata applicata sulle cellule per 5 minuti e poi è stato fatto un lavaggio in PBS. In fine sono state osservate le cellule.

CAPITOLO 3: RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 CURVA DI CALIBRAZIONE DEL LIVE PA

Nel Live Box 2 sono stati analizzati gli andamenti della pressione al variare dell'attuazione con il LivePa. I test sono stati effettuati con la pompa impostata prima a 100 μL/min e poi a 200 μL/min e calcolando i rapporti incrementali, andando prima a comprimere il tubo in uscita prima dalla camera basale e poi da quella apicale.

3.1.1 MISURAZIONI IN CAMERA BASALE

Inserendo all'interno del grafico a dispersione x/y i risultati ottenuti dai test sperimentali è stato osservato che il valore della pressione in camera basale, per entrambi i flussi, mostra inizialmente un aumento lineare all'aumentare del passo incrementale applicato e con poca differenza fra i passi 2,3 e 5, per poi crescere in maniera esponenziale dal passo 5 al passo 6 e successivi.

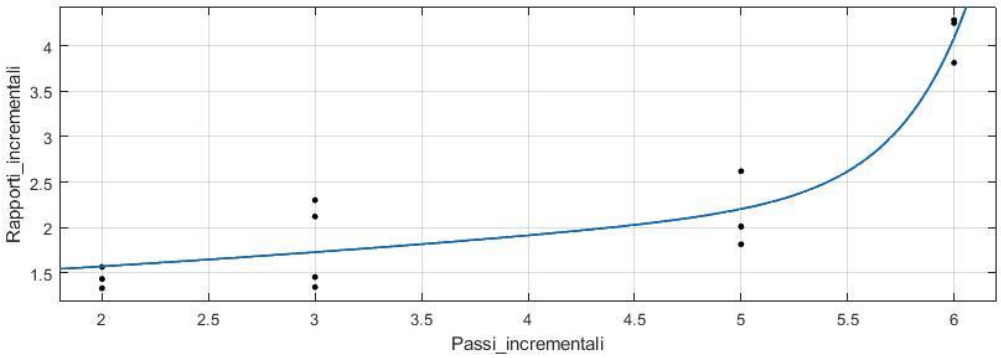


Figura 30: curva interpolante i rapporti incrementali in camera basale a 100 μL/min

Al fine di stimare l'andamento della pressione al variare del passo incrementale so è effettuato un fit tramite l'equazione già indicata nella sezione metodi, e che, come detto, è la stessa adottata per entrambi i flussi:

$$f(x) = a_0 * e^{(a_1 * x)} + a_2 * e^{(a_3 * x)} + c$$

Dai valori sperimentali e tramite il fitting tool di Matlab® i coefficienti dell'equazione della retta di calibrazione ottenuti sono i seguenti:

Parametri	Valore (con 95% di confidenza)
a_0	0.4998 ± 7.715e+14
a_1	0.1516 ± 1.73e+14
a_2	1.61e-05 ± 2.386e+10
a_3	1.942 ± 2.305e+14
C	0.977 ± 8.115e+14
SSE	1.518
R^2	0.895
R^2_{adj}	0.8483
RMSE	0.4107

Tabella 2: coefficienti dell'equazione che fitta i dati acquisiti in camera basale a 100 µL/min, e dati relativi alla bontà del fitting

I parametri che sono stati restituiti dal fitting tool di Matlab®, e riportati nella tabella indicano sia i valori dei coefficienti dell'equazione che alcuni parametri relativi all'affidabilità della regressione lineare realizzata con questo software, nello specifico:

- SSE $=\sum[(y_i^* - y_i)^2]$: errore della somma dei quadrati ed indica la differenza fra l'errore reale e l'errore previsto.

- $\boldsymbol{R^2} = 1 - \frac{SSR}{TSS}$: è detto coefficiente di adattamento o di determinazione dei dati e indica la differenza fra i valori reali di y e quelli stimati dal modello di regressione (y^*). Il suo valore è compreso fra 0 ed 1, questi valori indicano rispettivamente che il modello non è in grado per nulla di predire l'andamento delle variabili indipendenti oppure che lo determina in maniera perfetta.

- SSR= $\sum\ (y_i^* - mean(y_i))^2$: somma dei quadrati residui; è la somma delle differenze al quadrato di valore predetto e la media della variabile dipendente; ed indica quanto bene la curva si adatta ai dati.

- TSS = $\sum[(y_i - \mathrm{mean(y)})^2]$: somma totale dei quadrati, ossia la somma delle differenze, al quadrato, dei valori reali di y e la media della stessa variabile; ed indica la variabilità del dataset.

- $\boldsymbol{R^2_{adj}} = \left\{\frac{n-1}{n-k-1} * R^2\right\}$: R^2 aggiustato che viene utilizzato per migliorare la bontà della regressione lineare inserendo nella formula k, che equivale al numero dei regressori (qui vale due perché ho due esponenziali). Il vantaggio sta nel fatto che il suo valore risente positivamente di un nuovo regressore solo quando questo effettivamente migliora il fitting dei dati.

- RMSE= $\sqrt{\frac{(y_i^* - y_i)^2}{n}}$: indica come varia il mio errore, più nello specifico, è una deviazione standard dell'errore e mi dice quanto il mio modello di regressione lineare funziona bene nella predizione dei valori.

L'andamento riscontrato con il flusso a 100 µL/min è stato riscontrato anche a 200 µL/min (fig. 30). I valori ottenuti sono leggermente maggiori, cosa dovuta al fatto che il flusso applicato era più alto.

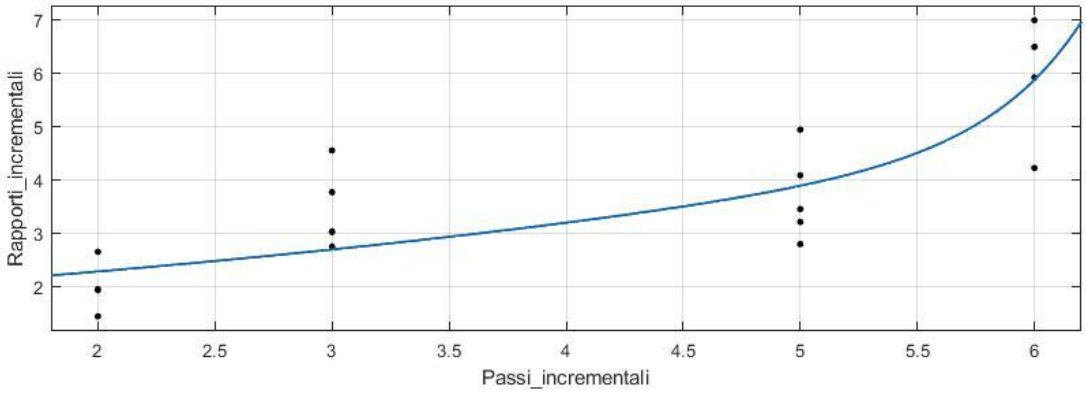


Figura 31: curva interpolante i rapporti incrementali in camera basale a 200 µL/min

L'equazione che interpola i punti, pur essendo la stessa utilizzata per il flusso minore, ha comunque valori dei coefficienti diversi e sono qui riportati:

Parametri	Valori
a_0	0.01409 ± 3.29e+11
a_1	0.9092 ± 3.5e+12
a_2	-14.93 ± 1.893e+22
a_3	-7.588 ± 6.377e+20
C	2.55 ± 7.779e+12
SSE	14.06
R^2	0.6611
R^2_{adj}	0.5568
RMSE	1.04

Tabella 3:coefficienti dell'equazione che fitta i dati acquisiti in camera basale a 200 µL/min, e dati relativi alla bontà del fitting

3.1.2 MISURAZIONI IN CAMERA APICALE

Allo stesso modo della camera basale, per la camera apicale è stato costruito un dataset per i medesimi passi incrementali e rapporti incrementali, utilizzando anche in questo caso come flussi 100 µL/min e 200 µL/min, e i dati sono stati analizzati tramite il fitting tool di Matlab.
Per entrambi i flussi è stato osservato un andamento che ricalcava quello osservato per la camera basale (fig. 31 e 32); tuttavia, i valori dei rapporti sono notevolmente minori. Questo comportamento lo si deve al fatto che la camera apicale è più grande di quella basale e quindi gli effetti della sovrapressione sono minori.
Questo significa che la membrana non si è mai deformata molto durante le attuazioni dei passi incrementali e dunque il volume delle camere è rimasto sempre quasi costante ampliando l'effetto della differenza di pressione registrata fra camera basale ed apicale, con effetto sui valori dei rapporti incrementali calcolati.

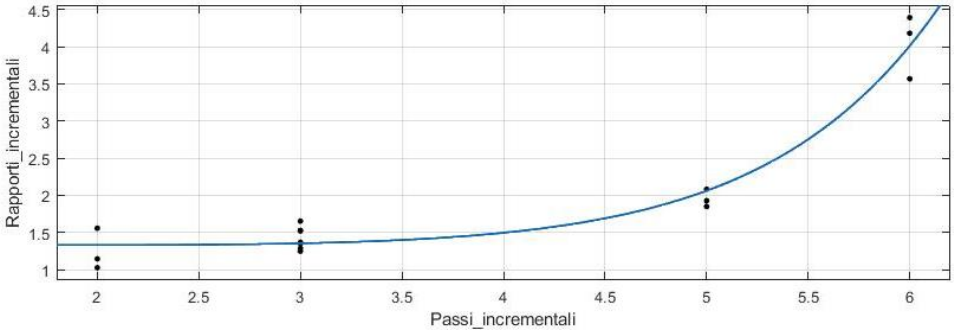


Figura 32: curva interpolante i rapporti incrementali in camera apicale a 100 µL/min

L'equazione utilizzata per descrivere l'andamento dei rapporti incrementali, come detto, è la stessa che interpola i dati della camera basale I valori dei coefficienti sono riportati nella tabella qui di seguito:

Parametri	Valore (con 95% di confidenza)
a_0	1.049 ± 3.125e+12
a_1	1.097 ± 3.045e+10
a_2	-0.1474 ± 1.26e+12
a_3	1.089 ± 3.105e+10
c	1.362 ± 1.041e+07
SSE	0.744
R^2	0.957
R^2_{adj}	0.9413
RMSE	0.2601

Tabella 4: coefficienti dell'equazione che fitta i dati acquisiti in camera apicale a 100 µL/min, e dati relativi alla bontà del fitting

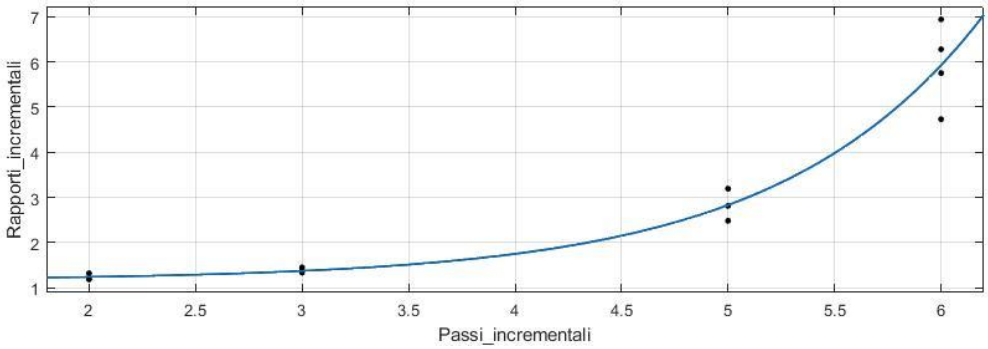


Figura 33: curva interpolante i rapporti incrementali in camera apicale a 200 µL/min

Parametri	Valore (con 95% di confidenza)
a_0	-0.02287 ± 1.944e+18
a_1	-3.167 ± 4.369e+19
a_2	0.008658 ± 2.4e+12
a_3	1.051 ± 4.238e+13
c	1.17 ± 1.092e+14
SSE	2.887
R^2	0.9469
R^2_{adj}	0.9204
RMSE	0.6007

Tabella 5: coefficienti dell'equazione che fitta i dati acquisiti in camera apicale a 200 µL/min, e dati relativi alla bontà del fitting

È stata osservata anche una differenza nei valori assoluti di pressione in camera fra le acquisizioni in statico e solo flusso; infatti, mentre in camera basale il flusso aveva un effetto maggiore sull'incremento della pressione, soprattutto a 200 µL/min, questo fenomeno è stato molto meno marcato in camera apicale dove la differenza di pressione osservata fra statico e controllo era molto più bassa.

3.2 ELETTROSPINNING

Dal processo di elettro filatura è stata realizzata una membrana con un modulo elastico (E) di 40 MPa e deformazione a rottura del 72% (*The Alveolus-on-a-Chip: A Biomimetic, Microfluidic in Vitro Model of the Alveolar-Capillary Barrier - Webthesis*, n.d.)

3.3 CARATTERIZZAZIONE DELLE MEMBRANA IN PCL/GL

Dalla caratterizzazione della nostra membrana sono emerso risultati incoraggianti per quanto riguarda le proprietà della nostra membrana in termini permeabilità, degradazione e risposta agli incrementi pressori.

3.3.1 ANALISI DI PERMEABILITÁ

Dal primo test di permeabilità con FD sono stati ottenuti tre valori di P_{app} relativi a ciascuno dei tre campioni preparati nelle transwell. Di questi valori è stata calcolata la media e la loro deviazione standard (Higuita-Castro N et al., 2017), ottenendo una permeabilità apparente di:

$$\overline{P_{app}} = 5,1E-05 \pm 4,1E-06 \ {}^{cm}/_{s}$$

Questo valore di permeabilità apparente è in linea con i risultati ottenuti da Higuita-Castro et al., in cui è emerso che la permeabilità è correlata con la percentuale di PCL; infatti, aumentando la sua concentrazione la permeabilità apparente della membrana diminuisce (Higuita-Castro N et al., 2017). Il risultato indica ottime proprietà di barriera della membrana, e ci aspettiamo che cellularizzandola la sua permeabilità apparente si riduca. Infatti, in letteratura, questo test è stato svolto anche in presenza di cellule, dimostrando che queste formano uno strato compatto con numerose adesioni strette e aderenti che hanno abbassato drasticamente la permeabilità apparente della membrana (Bhattacharya & Matthay, 2013; Higuita-Castro N et al., 2017).
Dalla prova svolta con le due bijoux, invece, al termine del tempo d'osservazione, non è stato monitorato un passaggio netto di liquido da una parte all'altra della membrana. Il risultato ottenuto mostra quindi che la nostra membrana in PCL/GL è poco permeabile ai liquidi.

3.3.2 TEST DI DEGRADAZIONE DELLA MEMBRANA IN PCL/GL

Le membrane in PCL/GL sono state testate, in termini di degradazione. Osservando i campioni al microscopio a scansione elettronica (SEM) (immagini 33 e 34) è stato constatato che la membrana ha mantenuto la propria architettura. Questo dato è stato molto importante per il nostro studio in quanto ci ha rassicurato dal punto di vista della resistenza della membrana in ambiente liquido e dinamico; le membrane non degradandosi non rilasciano detriti che potrebbero alterare il costrutto e l'ambiente cellulari. Da quanto osservato, quindi, è stato possibile dedurre che ogni del monostrato cellulare in LB2, è dovuto solo alla stimolazione applicata con il LivePa.

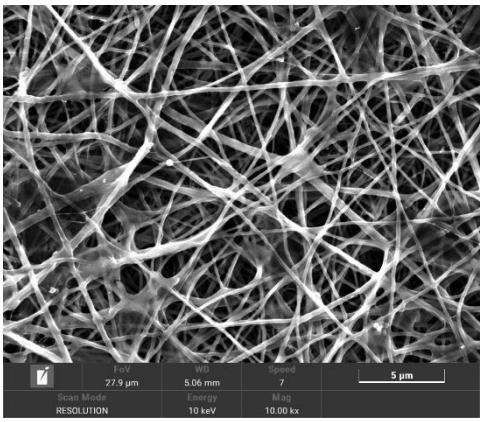


Figura 34: immagine SEM della membrana con ingrandimento 5 µm dopo una settimana

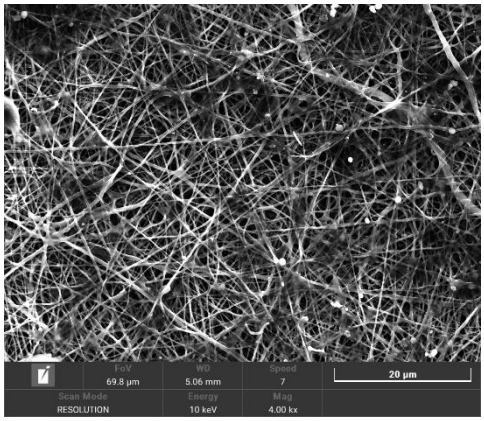
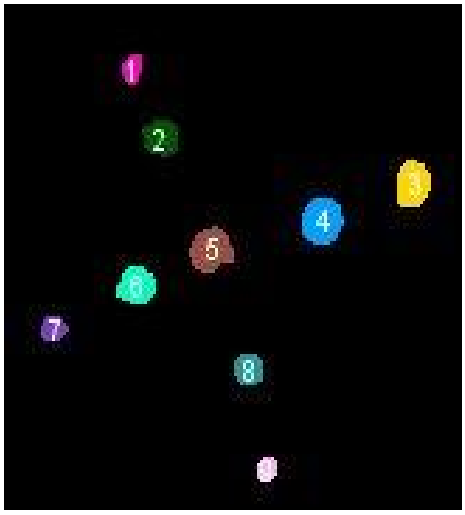


Figura 35: immagine SEM della membrana con ingrandimento 20 µm dopo una settimana

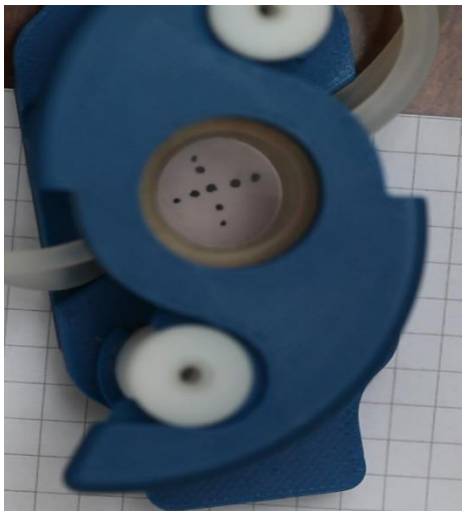
3.3.3 CARATTERIZZAZIONE DELLA DEFORMAZIONE DELLA MEMBRANA IN LB2

Dall'analisi dei fotogrammi estrapolati dai video è stato osservato che la membrana si deforma più al passaggio dalla condizione statica a quella di flusso attivato.
Applicando, in seguito, i passi incrementali è stato osservato che lo spostamento dei puntini marcati sulla membrana è molto lieve sia per il passo 2 che per il passo 3, infatti, un'analisi qualitativa, passando da controllo a condizione attuata non evidenzia uno spostamento significativo, fenomeno che, invece, è stato monitorato al passo 5.



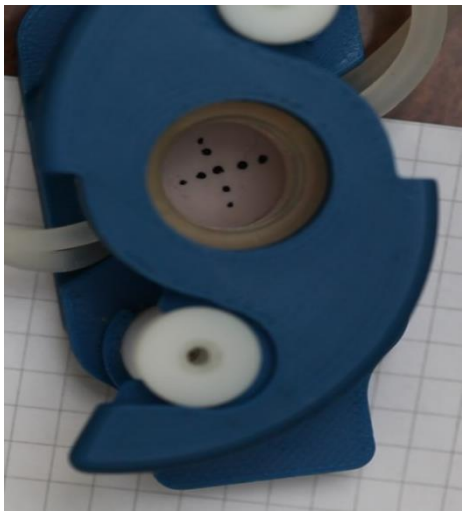
(a) *(b)*

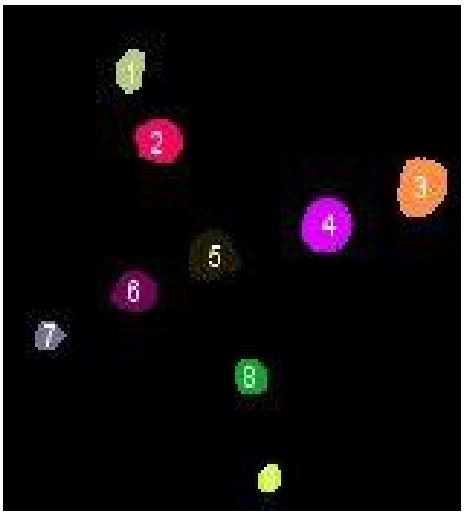
Figura 36: Statico prima (a) e dopo (b) l'analisi con il software ImageJ



(a) *(b)*

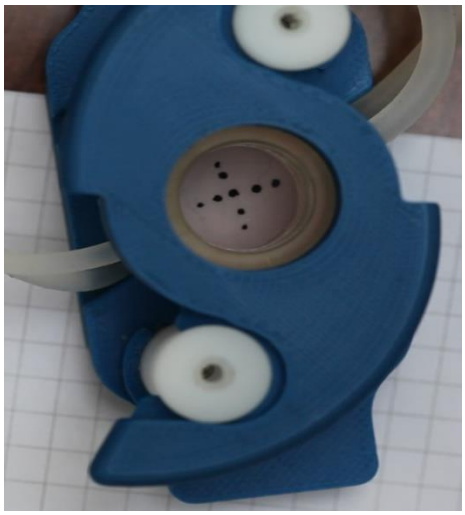
Figura 37: Controllo prima (a) e dopo (b) l'analisi con il software ImageJ

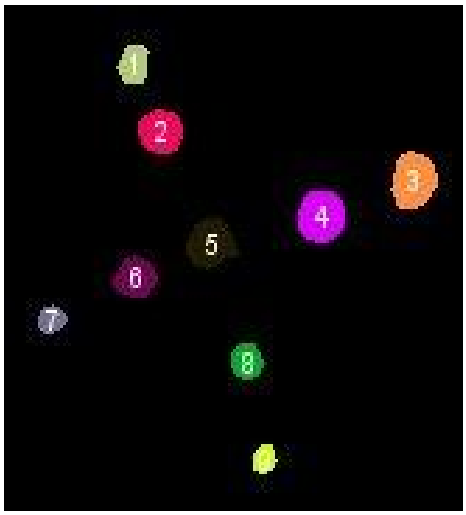




(a) *(b)*

Figura 38: Passo incrementale 2 prima (a) e dopo (b) l'analisi con il software ImageJ





(a) *(b)*

Figura 39: Passo incrementale 3 prima (a) e dopo (b) l'analisi con il software ImageJ

(a) *(b)*

Figura 40: Passo incrementale 5 prima (a) e dopo (b) l'analisi con il software ImageJ

Quanto osservato tuttavia è puramente qualitativo e molto difficile da stimare, in quanto dall'Analyze Particles del software ImageJ spesso i risultati ottenuti non avevano la sufficiente risoluzione per dare risultati statisticamente significativi; tuttavia, i video svolti lateralmente hanno confermato quanto su detto.
Grazie alla marcatura in rosso della membrana è stato possibile osservare lateralmente la sua deformazione nei casi di controllo e passi incrementali 2,3 e 5, notando una deformazione crescente della membrana, che tendeva a deformarsi verso la camera apicale. Questo lavoro di caratterizzazione dovrà essere ulteriormente sviluppato per identificare un metodo di analisi dedicato per avere una stima preventiva del movimento della membrana al variare della pressione all'interno della camera.
Il comportamento della membrana è dovuto alla sua maggiore elasticità rispetto alla classica membrana commerciale. Questa differenza ha portato anche ad una diminuzione dei rapporti incrementali calcolati durante l'applicazione dei passi 5, 6 e 7 in camera basale. Infatti, la membrana tendeva a deformarsi molto e ciò ha comportato un aumento del volume della camera basale e quindi una minor pressione registrata.
Il fenomeno è stato confermato anche dal calcolo dei rapporti incrementali. In particolare, è stato visto che il valore assoluto della pressione in camera tendeva a salire molto meno rispetto al caso con la membrana commerciale. Di conseguenza, i rapporti incrementali calcolati sono risultati molto più bassi (figura 40) rispetto a quelli ricavati con la membrana commerciale.

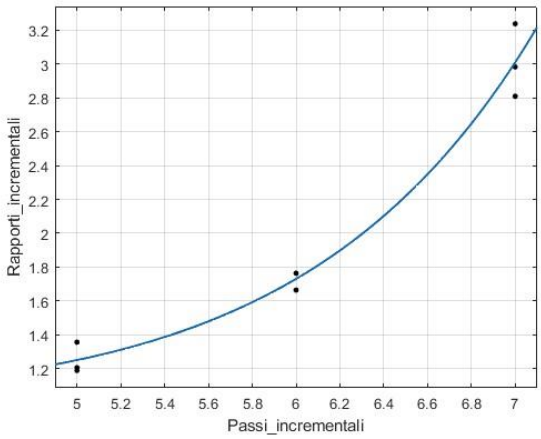


Figura 41: curva interpolante i rapporti incrementali in camera basale a 200 µL/min con la membrana in PCL/GL

Parametri	Valore (con 95% di confidenza)
a_0	0.5003 ± 9.374e+14
a_1	-0.1757 ± 1.596e+15
a_2	0.003101 ± 1.822e+12
a_3	0.9348 ± 7.277e+13
c	0.7094 ± 1.897e+15
SSE	0.1166
R^2	0.9771
R^2_{adj}	0.9542
RMSE	0.1707

Tabella 6: coefficienti dell'equazione[28] che fitta i dati acquisiti in camera basale a 200 µL/min con la membrana in PCL/GL, e dati relativi alla bontà del fitting

[28] L'equazione è la stessa che fitta i dati registrati con la membrana commerciale

3.4 ANALISI STATISTICA

Qui di seguito verranno riportati i risultati dell'analisi statistica relativa alle acquisizioni svolte con la membrana commerciale in PET 45 e con quella elettro filata in PCL/GL.

3.4.1 CAMERA BASALE

L'andamento descritto dalla curva di calibrazione viene rispecchiato anche negli istogrammi che descrivono l'andamento medio dei rapporti incrementali:

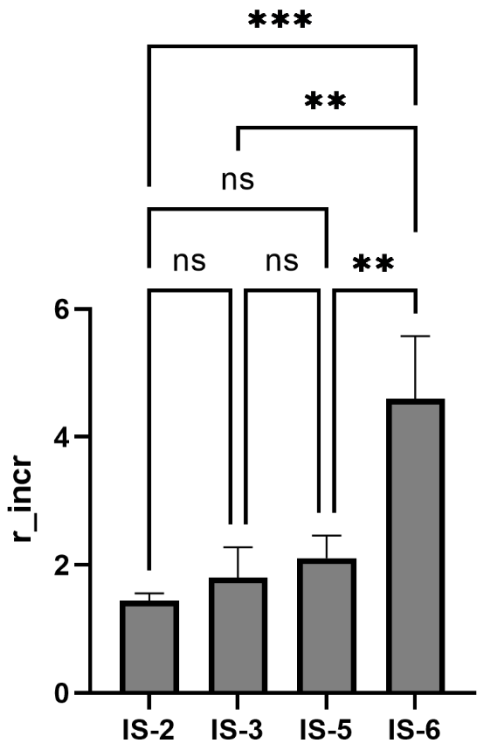


*Figura 42: istogrammi dei rapporti incrementali in camera basale a 100 µL/min, *p<0.05, **p<0.005, ***p<0.0005, ****p<0.0001*

Dal grafico emerge come non ci sia una differenza significativa fra i passi 2,3 e 5, mentre fra il passo 6 e tutti i precedenti c'è una differenza significativa molto spiccata.

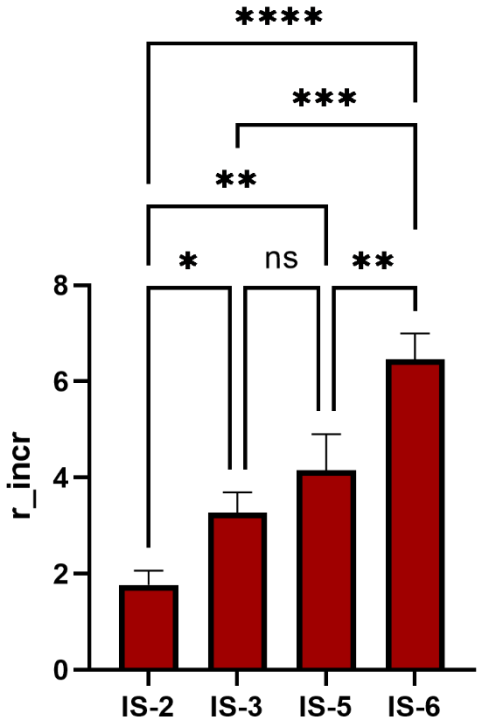


*Figura 43: istogrammi dei rapporti incrementali in camera basale a 200 µL/min, *p<0.05, **p<0.005, ***p<0.0005, ****p<0.0001*

Gli istogrammi riportati in figura 42 rappresentano la media dei rapporti incrementali acquisiti ai vari passi applicati con il modulo LivePa a 200 µL/min, e si può notare un notevole cambiamento rispetto al caso precedente; infatti, ora è emersa una differenza abbastanza significativa fra i passi 2 e 3 e fra i passi 5 e 2, mentre di nuovo fra i passi 5 e 3 non c'è. In fine, viene mantenuta la grande differenza significativa fra il passo 6 ed i precedenti, cosa che rispecchia l'andamento esponenziale dei rapporti incrementali.
Dunque, anche dall'andamento medio si può notare che a passi incrementali minori l'effetto della sovrapressione è meno marcato a causa del fatto che l'occlusione del tubo di uscita inizialmente è lieve, mentre cresce a passi più alti; infatti, al passo 6 l'ostruzione è quasi completa e l'effetto si nota nel valore del rapporto incrementale, esponenzialmente più alto degli altri.
Un effetto che viene amplificato anche dall'aumento del flusso, come è stato possibile notare nell'aumento dei rapporti incrementali calcolati e dalle differenze registrate ai 2 e 3 e fra i passi 5 e 2 che con il flusso più basso non sono emerse.

3.4.2 CAMERA APICALE

Come accaduto in camera basale, l'andamento della curva di calibrazione è ripreso anche dall'andamento medio dei rapporti incrementali calcolati e riportati nelle figure 43 e 44 assieme alle loro deviazioni standard:

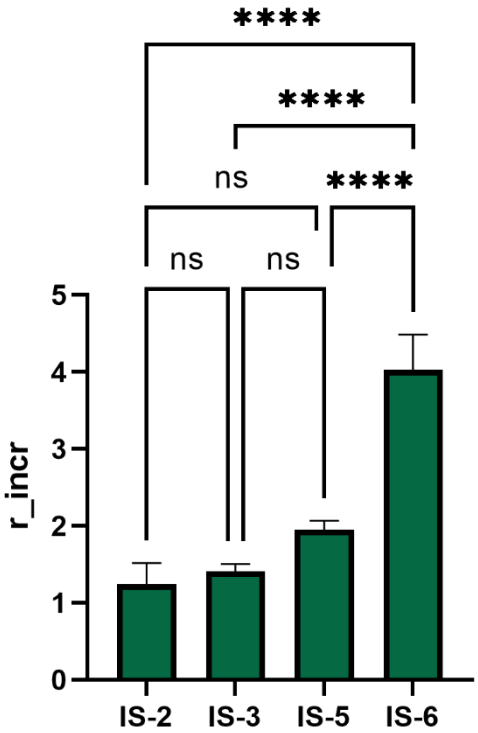


*Figura 44: istogrammi dei rapporti incrementali in camera apicale a 100 µL/min, *p<0.05, **p<0.005, ***p<0.0005, ****p<0.0001*

:

Dall'analisi statistica si osserva come non ci sia una differenza significativa fra i passi incrementali 2 e 3 e 5 mentre la significatività emerge quando si vanno a confrontare i passi precedenti con il passo 6, come accaduto anche in camera basale.

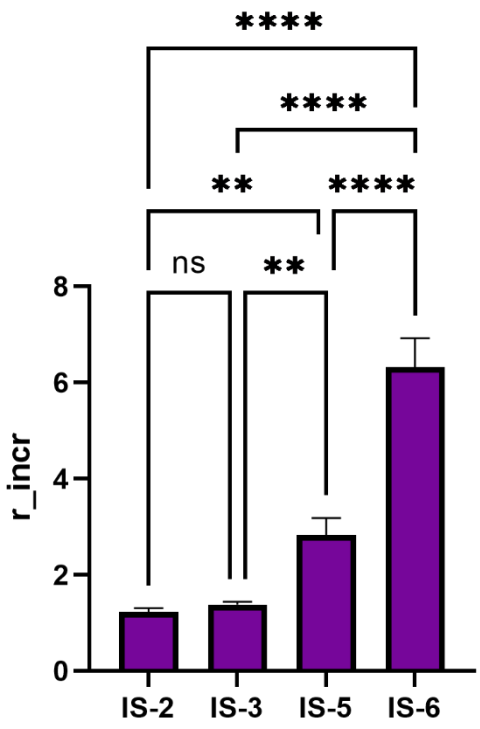


*Figura 45: istogrammi dei rapporti incrementali in camera apicale a 200 µL/min, *p<0.05, **p<0.005, ***p<0.0005, ****p<0.0001*

Una correlazione più spiccata fra l'incremento del passo applicato e del rapporto ottenuto emerge di nuovo aumentando il flusso; infatti, ergono delle differenze significative fra tutti i passi applicati, fanno eccezione i passi 2 e 3 fra i quali questa differenza non è emersa.
Qui si ha di nuovo la prova del fatto che a passi bassi i rapporti hanno un valore inferiore e quindi il rapporto incrementale è molto basso, in quanto il tuo d'uscita della camera è meno ostruito rispetto invece ai passi più alti dove l'effetto d'incremento pressorio è più netto perché l'occlusione è più marcata, a 6 ad esempio è quasi totale.

3.4.3 CAMERA BASALE CON MEMBRANA IN PCL/GL

Anche con la nostra membrana l'andamento medio dei passi incrementali rispecchia quello della curva di calibrazione come si può notare dalla figura 45, con un andamento che cresce esponenzialmente all'aumentare del passo incrementale applicato.

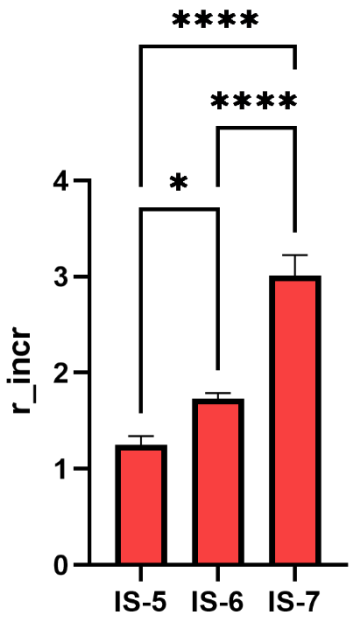


*Figura 46: istogrammi dei rapporti incrementali in camera apicale a 200 µL/min, *p<0.05, **p<0.005, ***p<0.0005, ****p<0.0001*

In questo caso, dal punto di vista statistico si può affermare che c'è una differenza significativa fra tutti i passi testati, una differenza notevole rispetto alla membrana commerciale dove ai passi più bassi questa differenza non è emersa. Un confronto che è da considerare valido, nonostante i passi testati con la nostra membrana siano 5, 6 e 7 perché, la sua elasticità fa percepire al sistema una stimolazione che è pari a quella che avrebbe con due passi incrementali in meno con la membrana commerciale.
Questo risultato consente di affermare che con la nostra membrana c'è una maggiore sensibilità del sistema ad eventuali sollecitazioni esterne, un comportamento più simile alla barriera emato-gassosa fisiologica, che con una semplice membrana commerciale non si riesce a riprodurre.

3.5 SEMINA CELLULARE

Come detto in precedenza, passati i sette giorni di coltura in dinamico, i nuclei delle cellule sono stati mercati con il DAPI, mentre i loro citoscheletri con la falloidina e poi sono state osservate al microscopio. Dall'osservazione delle cellule mantenute in dinamico è emerso che sia le A549 che le HULEC-5a aderiscono bene alla membrana in PCL/GL, mostrando un ottimo spreading cellulare. Le cellule, infatti formano uno strato compatto e bene adeso alla membrana, con un orientamento che sembra seguire la direzione della deformazione imposta alla membrana in seguito all'applicazione del passo incrementale.

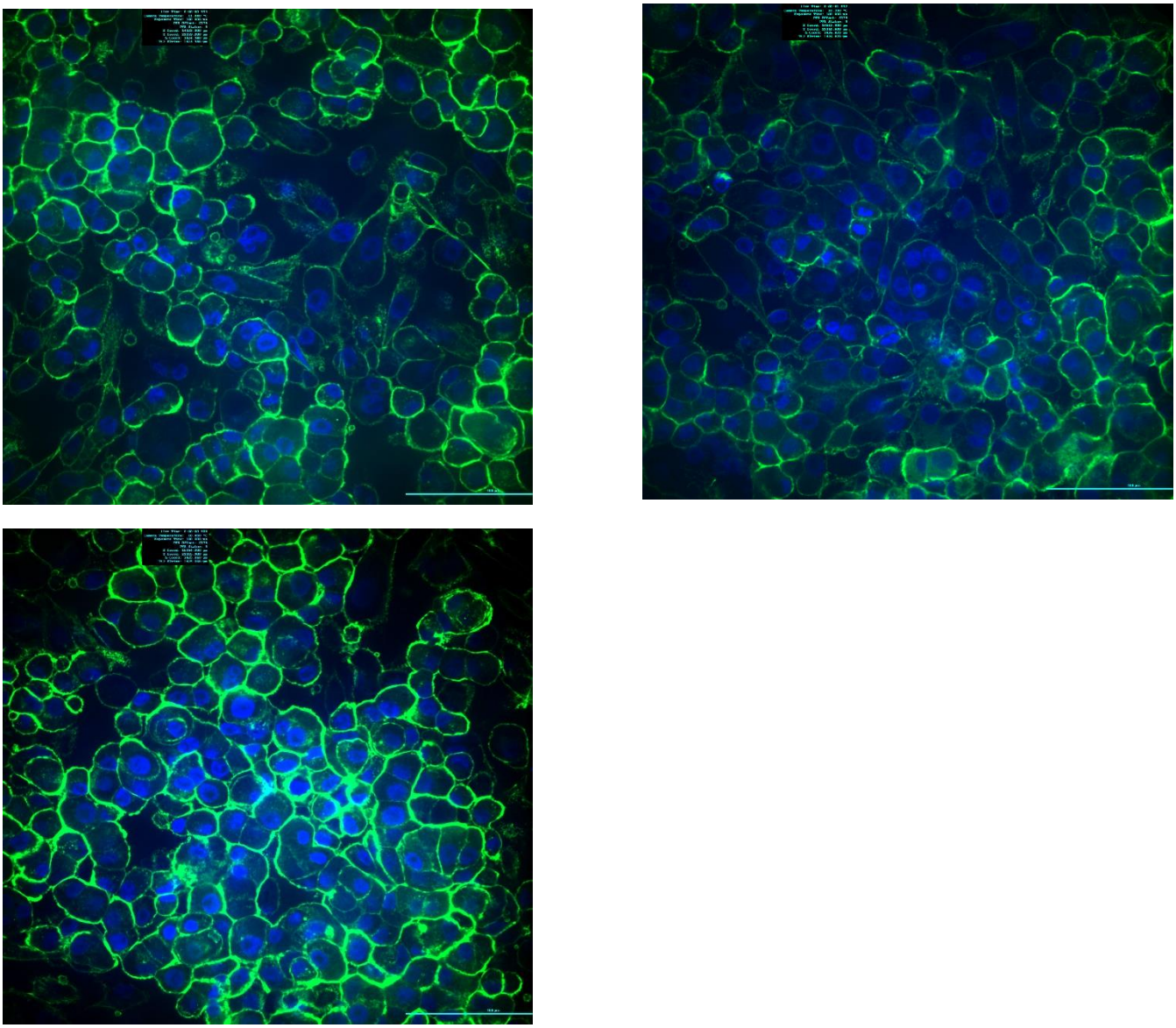


Figura 47: immagini in microscopia confocale delle cellule A549 seminate in camera apicale. I nuclei sono stati marcati con il DAPI mentre i citoscheletri con la falloidina. La scala delle immagini è 100 µm

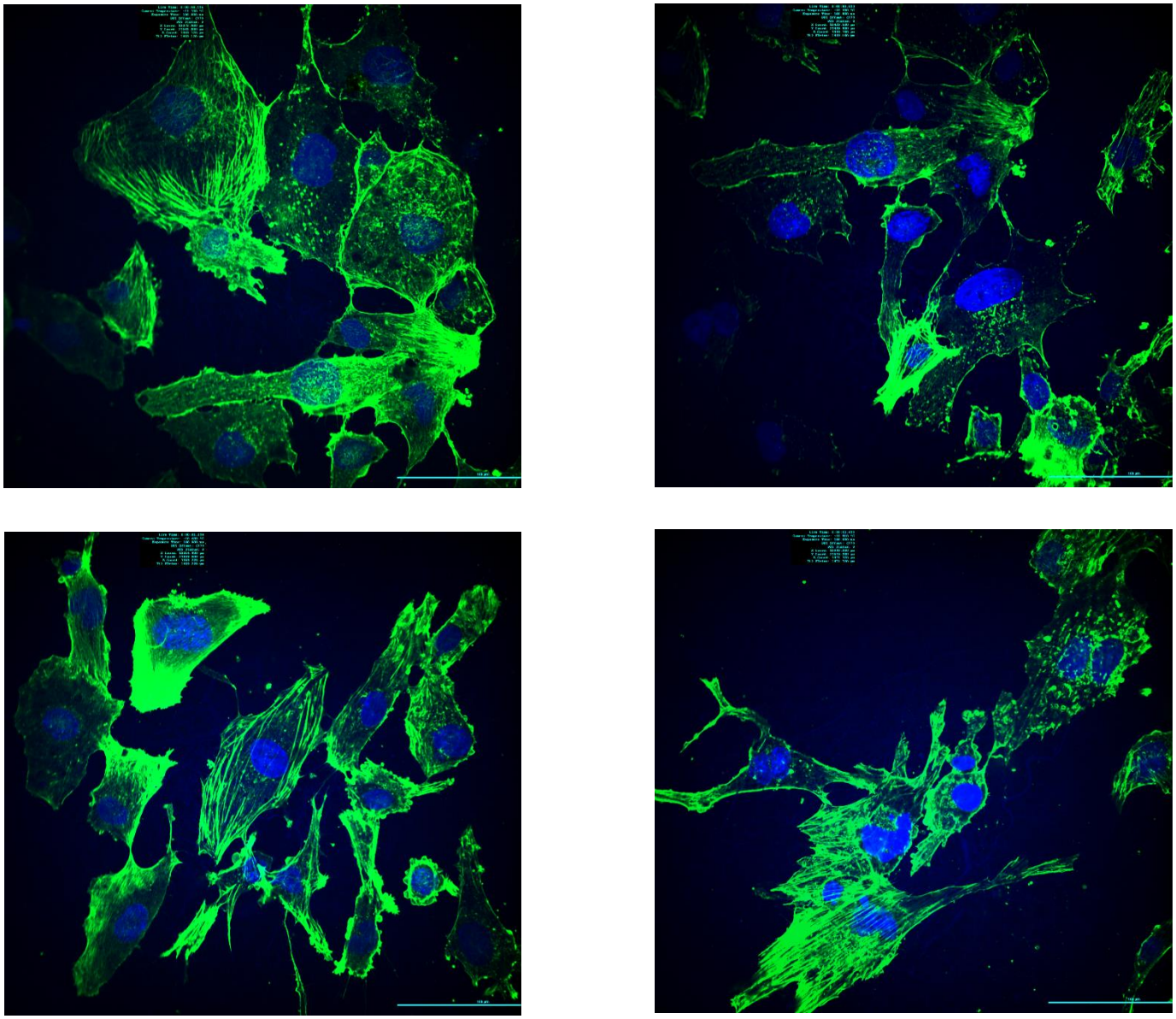


Figura 48: immagini in microscopia confocale delle cellule HULEC-5a seminate in camera basale. I nuclei sono stati marcati con il DAPI mentre i citoscheletri con la falloidina. La scala delle immagini è 100 µm

Quindi dai risultati cellulari, si potrebbe dire che le cellule grazie alla stimolazione crescono bene sulla nostra membrana formando un costrutto maturo ed orientato.

CAPITOLO 4: CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI

I bioreattori sono dei sistemi di coltura che hanno permesso di compiere passi avanti nel campo della ricerca, consentendo di realizzare modelli di coltura dinamici ricreando l'ambiente fisiologico di crescita cellulare.
Le possibilità offerte da questi sistemi di coltura sono altissime in quanto consentono di realizzare, *in vitro*, costrutti di organi e tessuti in ambiente dinamico e con gli opportuni stimoli fisico-chimici.
In molti studi sono stati utilizzati i bioreattori anche per cercare di rigenerare organi, sia popolando con cellule umane organi animali decellularizzati che fungono da scaffold, sia cercando di riprodurre l'organo genesi in ambiente dinamico e sotto stimolazione.
Nel senso più ampio della parola si possono considerare bioreattori anche i sistemi microfluidici, all'interno dei quali sono stati riprodotti modelli di organi in scala millimetrica/micrometrica consentendo di risparmiare in termini di costi e tempi di sperimentazione.
Gli organ-on-chip si sono rivelati molto utili nello svolgimento di test di tossicità di alcuni farmaci o nello studio delle dinamiche di molte patologie.
Sia i sistemi microfluidici che i bioreattori come il LiveBox2 possono essere interconnessi fra di loro per andare a mimare il crosstalk fra gli organi ed eventualmente fare studi di farmacodinamica e farmacocinetica *in vitro*, oppure per studiare il meccanismo metastatico di alcune tipologie di tumore.
Nel presente lavoro di tesi, il bioreattore LiveBox2, essendo dotato di una camera basale ed una apicale, ha consentito di creare un modello di barriera alveolo-capillare utilizzando come substrato di coltura una membrana elettro filata in PCL/GL (80:20).
Creando un circuito in cui la camera di coltura è stata connessa ad una pompa peristaltica, a dei reservoirs e ad un attuatore meccanico, ha consentito di simulare la componente dinamica della respirazione mediante l'attuazione di una stimolazione statica con il LivePa.
Per prima cosa è stato calibrato il LivePa al fine di osservare come l'aumento dell'ostruzione applicata ai tubi in uscita dal LiveBox2 influenzava l'incremento pressorio nelle due camerette, inserendo nell'intermezzo una membrana porosa commerciale in PET. Nell'analisi sono stati testati due flussi 100 µL/min e 200 µL/min e quattro passi incrementali (2, 3, 5 e 6) ostruendo prima il tubo d'uscita dalla camera basale e poi quello della camera apicale. Con i dati ricavati sono state costruite quattro curve di calibrazione, due per la camera basale e due per quella apicale, ottenendo una tendenza di crescita esponenziale dei rapporti incrementali in funzione dei passi attuati.

Il passo successivo è stato quello di realizzare la nostra membrana in PCL/GL con rapporto 80:20, utilizzando come reticolante il GPTMS, scelto per le ottime rese di reticolazione della GL, come è stato dimostrato nello studio di Tonda-Turo et. al (Tonda-Turo et al., 2013).
La membrana è stata caratterizzata in termini di permeabilità facendo test in statico con FD e applicando una sovrapressione idraulica, ottenendo un'ottima tenuta da parte della membrana, comportamento che rispecchia quello della barriera fisiologica, che consente solo il passaggio di gas ma non di liquido.
Poi, è stato osservato il comportamento della membrana all'interno del LiveBox2, facendo delle riprese in controllo ed attuato a tre diversi passi (2, 3 e 5), constatando visivamente l'alta elasticità della membrana.
La calibrazione del LivePa è stata fatta anche con la nostra membrana in PCL/GL, andando però a fare un'analisi a 200 µL/min e solo in camera basale, applicando i passi 5, 6 e 7.
È stato osservato che i rapporti incrementali crescevano allo stesso modo visto con la membrana commerciale, tuttavia con valori dei rapporti molto più bassi, il che era in linea con la maggiore capacità della nostra membrana di deformarsi rispetto a quella commerciale.
Poi, sono stati svolti dei test cellulari con due fenotipi, cellule epiteliali umane A549 per riprodurre l'epitelio in camera apicale, e cellule umane endoteliali HULEC-5a per mimare l'endotelio capillare in camera basale. Le cellule sono state coltivate in interfaccia liquido-liquido, mezzo per epiteliali in camera apicale e mezzo per endoteliali in basale. I test cellulari sono stati svolti in tre diverse modalità di coltura: una statica, una in controllo e un'altra con attuato a passo incrementale 6. Le cellule sono state mantenute in coltura per sette giorni e poi sono stati marcati i loro citoscheletri con falloidina e i loro nuclei con il DAPI e poi sono state osservate al microscopio.
Dai dati ricavati dalle immagini delle cellule mantenute in attuato è emerso che entrambe le popolazioni cellulari hanno reagito bene alle condizioni di coltura; con l'orientamento delle cellule, che sembra seguire la direzione dello stretching imposto alla membrana dalla stimolazione con il LivePa.
I risultati ottenuti sono un'ulteriore conferma dell'incredibile potenziale offerto dai bioreattori, che consentendo di riprodurre modelli di tessuti e organi umani *in vitro* potrebbero offrire la possibilità di ridurre l'utilizzo degli animali nell'ambito delle indagini precliniche e di avere modelli più predittivi ed affidabili in quanto consentono di realizzare costrutti biomimetici sia per il bioambiente dinamico, tridimensionale ed eterotipico, ma anche perché si possono utilizzare cellule umane.
Dal presente studio si potrebbe partire per fare ulteriori calibrazioni del LivePa andando a fare delle acquisizioni in cui si monitora la pressione in una camera

occludendo l'altra; inoltre, si dovrebbe poi completare lo studio con le cellule andando a studiare la risposta delle cellule anche a sollecitazioni con i passi 5 e 7. L'upgrade ulteriore sarebbe quello di passare ad uno studio in interfaccia aria-liquido (ALI), studiando l'andamento dei rapporti incrementali sia senza le cellule che con le cellule, occludendo il tubo d'uscita dalla camera basale. Il modulo ALI potrebbe rivelarsi un ottimo strumento d'indagine anche per studiare l'effetto tossico di alcune particelle oppure, realizzando delle colture in più LiveBoxes, si potrebbe realizzare un circuito interconnesso fra organi *in vitro* e svolgere studi sull'efficacia di nuove terapie, oppure sullo sviluppo di determinate patologie; in alternativa sarebbe possibile creare dei modelli personalizzati di organi e sviluppare nuovi metodi di diagnosi, prognosi e prevenzione personalizzati ed efficaci.
Il sistema potrebbe essere modificato anche andando ad introdurre un attuatore meccanico in grado di generare una sovrapressione non più statica ma ciclica. Il fine potrebbe essere quello di stimolare le cellule in maniera molto più simile a come avviene nel ciclo della respirazione fisiologica, ottenendo così un costrutto di barriera alveolo capillare cresciuto *in vitro* in un ambiente più simile possibile a quello fisiologico.

RIFERIMENTI

Ahmady, A., & Samah, N. H. A. (2021). A review: Gelatine as a bioadhesive material for medical and pharmaceutical applications. *International Journal of Pharmaceutics*, *608*, 121037.

Amabili M, T. E. (2020). *Identification of viscoelastic properties of Dacron aortic grafts subjected to physiological pulsatile flow—PubMed*. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32898986/

Archer, F., Bobet-Erny, A., & Gomes, M. (2021). State of the art on lung organoids in mammals. *Veterinary Research*, *52*(1), 1–10.

Barbatelli, G., Bertoni, L., Boccafoschi, F., Bosetti, M., Carini, F., Congiu, T., Cortese, K., D'Amico, A. G., Dolci, C., & Fais, F. (2018). *Anatomia umana: Fondamenti: con istituzioni di istologia*.

Bhattacharya, J., & Matthay, M. A. (2013). Regulation and repair of the alveolar-capillary barrier in acute lung injury. *Annual Review of Physiology*, *75*(1), 593–615.

Bhowmick, R., Derakhshan, T., Liang, Y., Ritchey, J., Liu, L., & Gappa-Fahlenkamp, H. (2018). A three-dimensional human tissue-engineered lung model to study influenza A infection. *Tissue Engineering Part A*, *24*(19–20), 1468–1480.

Bodenberger, N., Kubiczek, D., Paul, P., Preising, N., Weber, L., Bosch, R., Hausmann, R., Gottschalk, K.-E., & Rosenau, F. (2017). Beyond bread and beer: Whole cell protein extracts from baker's yeast as a bulk source for 3D cell culture matrices. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *101*(5), 1907–1917.

Bradley, K., McConnell-Breul, S., & Crystal, R. G. (1974). Lung collagen heterogeneity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *71*(7), 2828–2832. https://doi.org/10.1073/pnas.71.7.2828

Bustos, C. A., García–Herrera, C. M., & Celentano, D. J. (2016). Modelling and simulation of the mechanical response of a Dacron graft in the pressurization test and an end-to-end anastomosis. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, *61*, 36–44.

Campiglio, C. E., Contessi Negrini, N., Farè, S., & Draghi, L. (2019). Cross-linking strategies for electrospun gelatin scaffolds. *Materials*, *12*(15), 2476.

Cardiogenic Pulmonary Edema—PubMed. (n.d.). Retrieved June 20, 2022, from https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31813466/

Çaykara, T., Sande, M. G., Azoia, N., Rodrigues, L. R., & Silva, C. J. (2020). Exploring the potential of polyethylene terephthalate in the design of antibacterial surfaces. *Medical Microbiology and Immunology*, *209*(3), 363–372.

Cei, D., Ahluwalia, A., & Schmid, O. (2014). *DEVELOPMENT OF A DYNAMIC MODEL OF THE ALVEOLAR INTERFACE FOR THE STUDY OF AEROSOL DEPOSITION*.

Chang, S.-H., Ko, P.-L., Liao, W.-H., Peng, C.-C., & Tung, Y.-C. (2021). Transwell Insert-Embedded Microfluidic Devices for Time-Lapse Monitoring of Alveolar Epithelium Barrier Function under Various Stimulations. *Micromachines*, *12*(4), 406. https://doi.org/10.3390/mi12040406

Chazotte, B. (2011). *Labeling nuclear DNA using DAPI. Cold Spring Harb Protoc 6: Pdb. prot5556*.

Chung, H. H., Mireles, M., Kwarta, B. J., & Gaborski, T. R. (2018). Use of porous membranes in tissue barrier and co-culture models. *Lab on a Chip*, *18*(12), 1671–1689.

Ciliated muconodular papillary tumor of the lung: A case report and literature review—PubMed. (n.d.). Retrieved June 20, 2022, from https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31749068/

Clevers H., S. N. (2022, June 20). *Long-term expanding human airway organoids for disease modeling | The EMBO Journal*. https://www.embopress.org/doi/full/10.15252/embj.2018100300

Corrò, C., Novellasdemunt, L., & Li, V. S. W. (2020). A brief history of organoids. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, *319*(1), C151–C165. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00120.2020

Crowley, L. C., Marfell, B. J., & Waterhouse, N. J. (2016). Analyzing cell death by nuclear staining with Hoechst 33342. *Cold Spring Harbor Protocols*, *2016*(9), pdb-prot087205.

Cushing, M. C., & Anseth, K. S. (2007). Materials science. Hydrogel cell cultures. *Science (New York, N.Y.)*, *316*(5828), 1133–1134. https://doi.org/10.1126/science.1140171

Ding, S., Zhang, H., & Wang, X. (2021). Microfluidic-Chip-Integrated Biosensors for Lung Disease Models. *Biosensors*, *11*(11), 456.

Doryab, A., Taskin, M. B., Stahlhut, P., Schröppel, A., Orak, S., Voss, C., Ahluwalia, A., Rehberg, M., Hilgendorff, A., & Stöger, T. (2021). A bioinspired in vitro lung model to study particokinetics of nano-/microparticles under cyclic stretch and air-liquid interface conditions. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *9*, 616830.

Drobota, M., Gradinaru, L. M., Vlad, S., Bargan, A., Butnaru, M., Angheloiu, M., & Aflori, M. (2020). Preparation and Characterization of Electrospun Collagen Based Composites

for Biomedical Applications. *Materials*, *13*(18), 3961. https://doi.org/10.3390/ma13183961

Duval, K., Grover, H., Han, L.-H., Mou, Y., Pegoraro, A. F., Fredberg, J., & Chen, Z. (2017). Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology (Bethesda, Md.)*, *32*(4), 266–277. https://doi.org/10.1152/physiol.00036.2016

Essaouiba, A., Jellali, R., Shinohara, M., Scheidecker, B., Legallais, C., Sakai, Y., & Leclerc, E. (2021). Analysis of the behavior of 2D monolayers and 3D spheroid human pancreatic beta cells derived from induced pluripotent stem cells in a microfluidic environment. *Journal of Biotechnology*, *330*, 45–56.

Fontana, G., Gershlak, J., Adamski, M., Lee, J.-S., Matsumoto, S., Le, H. D., Binder, B., Wirth, J., Gaudette, G., & Murphy, W. L. (2017). Biofunctionalized plants as diverse biomaterials for human cell culture. *Advanced Healthcare Materials*, *6*(8), 1601225.

Garg K, & Bowlin G. (2011). *Electrospinning jets and nanofibrous structures—PubMed*. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21522493/

Gautam, S., Dinda, A. K., & Mishra, N. C. (2013). Fabrication and characterization of PCL/gelatin composite nanofibrous scaffold for tissue engineering applications by electrospinning method. *Materials Science and Engineering: C*, *33*(3), 1228–1235.

Gil-Castell, O., Badia, J. D., Ontoria-Oviedo, I., Castellano, D., Sepúlveda, P., & Ribes-Greus, A. (2020). Polycaprolactone/gelatin-based scaffolds with tailored performance: In vitro and in vivo validation. *Materials Science and Engineering: C*, *107*, 110296.

Giuntoli, G., Muzio, G., Actis, C., Ganora, A., Calzone, S., Bruno, M., Ciardelli, G., Carmagnola, I., & Tonda-Turo, C. (2021). In-Vitro Characterization of a Hernia Mesh Featuring a Nanostructured Coating. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *8*, 589223.

Hansoo Park, N.-E. R. (2019). *Spheroid Culture System Methods and Applications for Mesenchymal Stem Cells—PubMed*. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31842346/

Higuita-Castro N, Nelson MT, & Shukla V. (2017). *Using a Novel Microfabricated Model of the Alveolar-Capillary Barrier to Investigate the Effect of Matrix Structure on Atelectrauma—PubMed*. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28912466/

Hivechi, A., Milan, P. B., Modabberi, K., Amoupour, M., Ebrahimzadeh, K., Gholipour, A. R., Sedighi, F., Amini, N., Bahrami, S. H., & Rezapour, A. (2021). Synthesis and characterization of exopolysaccharide encapsulated PCL/gelatin skin substitute for full-thickness wound regeneration. *Polymers*, *13*(6), 854.

Huh, D., Matthews, B. D., Mammoto, A., Montoya-Zavala, M., Hsin, H. Y., & Ingber, D. E. (2010). Reconstituting organ-level lung functions on a chip. *Science (New York, N.Y.)*, *328*(5986), 1662–1668. https://doi.org/10.1126/science.1188302

Imamura, Y., Mukohara, T., Shimono, Y., Funakoshi, Y., Chayahara, N., Toyoda, M., Kiyota, N., Takao, S., Kono, S., & Nakatsura, T. (2015). Comparison of 2D-and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer. *Oncology Reports*, *33*(4), 1837–1843.

Jensen, C., & Teng, Y. (2020). Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? *Frontiers in Molecular Biosciences*, *7*, 33. https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00033

Kaplan DL, 19. Sundarakrishnan A. (2022, June 20). *Engineered cell and tissue models of pulmonary fibrosis—PubMed*. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29269274/

Kapuscinski, J. (1995). DAPI: A DNA-specific fluorescent probe. *Biotechnic & Histochemistry*, *70*(5), 220–233.

Kidoaki, S., Kwon, I. K., & Matsuda, T. (2005). Mesoscopic spatial designs of nano-and microfiber meshes for tissue-engineering matrix and scaffold based on newly devised multilayering and mixing electrospinning techniques. *Biomaterials*, *26*(1), 37–46.

König, I. R., Fuchs, O., Hansen, G., von Mutius, E., & Kopp, M. V. (2017). What is precision medicine? *The European Respiratory Journal*, *50*(4), 1700391. https://doi.org/10.1183/13993003.00391-2017

Kuehn, A., Kletting, S., de Souza Carvalho-Wodarz, C., Repnik, U., Griffiths, G., Fischer, U., Meese, E., Huwer, H., Wirth, D., & May, T. (2016). *Human alveolar epithelial cells expressing tight junctions to model the air-blood barrier.*

Lapomarda, A., Pulidori, E., Cerqueni, G., Chiesa, I., De Blasi, M., Geven, M. A., Montemurro, F., Duce, C., Mattioli-Belmonte, M., & Tiné, M. R. (2021). Pectin as rheology modifier of a gelatin-based biomaterial ink. *Materials*, *14*(11), 3109.

Law, J. X., Liau, L. L., Saim, A., Yang, Y., & Idrus, R. (2017). Electrospun Collagen Nanofibers and Their Applications in Skin Tissue Engineering. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, *14*(6), 699–718. https://doi.org/10.1007/s13770-017-0075-9

LeCluyse, E. L., Audus, K. L., & Hochman, J. H. (1994). Formation of extensive canalicular networks by rat hepatocytes cultured in collagen-sandwich configuration. *The American Journal of Physiology*, *266*(6 Pt 1), C1764-1774. https://doi.org/10.1152/ajpcell.1994.266.6.C1764

Liu, F., & Wang, X. (2020). Synthetic Polymers for Organ 3D Printing. *Polymers*, *12*(8), E1765. https://doi.org/10.3390/polym12081765

Liu, G., Bian, W., Zu, G., Liu, J., Zhang, G., Li, C., & Jiang, G. (2021). Development of a 3D Printed Lung Model Made of Synthetic Materials for Simulation. *The Thoracic and Cardiovascular Surgeon*.

Lorenzo Lucantonio. (n.d.). *Recettori dell'immunità innata*. https://www.biopills.net/. file:///C:/Users/matte/Desktop/recettori-cellulari-dellimmunit%C3%A0-innata.pdf

Lu, Y., Ma, J., & Lin, G. (2019). Development of a two-layer transwell co-culture model for the in vitro investigation of pyrrolizidine alkaloid-induced hepatic sinusoidal damage. *Food and Chemical Toxicology*, *129*, 391–398.

Lykov AP, B. AA. (2019). *[Effect of polyethylene terephthalate (Dacron®) on functional potential of human bone-marrow/progenitor stem cells]. | StemBook*. https://www.stembook.org/node/26297

Martin, I., Wendt, D., & Heberer, M. (2004). The role of bioreactors in tissue engineering. *Trends in Biotechnology*, *22*(2), 80–86. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2003.12.001

Matute-Bello, G., Frevert, C. W., & Martin, T. R. (2008). Animal models of acute lung injury. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, *295*(3), L379–L399.

Mazzei, D., Guzzardi, M. A., Giusti, S., & Ahluwalia, A. (2010). A low shear stress modular bioreactor for connected cell culture under high flow rates. *Biotechnology and Bioengineering*, *106*(1), 127–137.

Meghani, N., Kim, K. H., Kim, S. H., Lee, S. H., & Choi, K. H. (2020). Evaluation and live monitoring of pH-responsive HSA-ZnO nanoparticles using a lung-on-a-chip model. *Archives of Pharmacal Research*, *43*(5), 503–513.

Melan, M. A. (1994). Overview of cell fixation and permeabilization. *Immunocytochemical Methods and Protocols*, 55–66.

Mishra, D. K., & Kim, M. P. (2018). Acellular and cellular lung model to study tumor metastasis. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, *138*, e58145.

Mishra, D. K., Sakamoto, J. H., Thrall, M. J., Baird, B. N., Blackmon, S. H., Ferrari, M., Kurie, J. M., & Kim, M. P. (2012). Human lung cancer cells grown in an ex vivo 3D lung model produce matrix metalloproteinases not produced in 2D culture. *PloS One*, *7*(9), e45308. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045308

Mittal, R., Woo, F. W., Castro, C. S., Cohen, M. A., Karanxha, J., Mittal, J., Chhibber, T., & Jhaveri, V. M. (2019). Organ-on-chip models: Implications in drug discovery and clinical applications. *Journal of Cellular Physiology*, *234*(6), 8352–8380.

Nadkarni, R. R., Abed, S., & Draper, J. S. (2016). Organoids as a model system for studying human lung development and disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *473*(3), 675–682.

Nova, Z., Skovierova, H., & Calkovska, A. (2019). Alveolar-Capillary Membrane-Related Pulmonary Cells as a Target in Endotoxin-Induced Acute Lung Injury. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(4), E831. https://doi.org/10.3390/ijms20040831

Petersen, I. (2011). The morphological and molecular diagnosis of lung cancer. *Deutsches Ärzteblatt International*, *108*(31–32), 525.

Rajzer, I., Menaszek, E., Kwiatkowski, R., Planell, J. A., & Castano, O. (2014). Electrospun gelatin/poly (ε-caprolactone) fibrous scaffold modified with calcium phosphate for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, *44*, 183–190.

Ramaswami, R., Bayer, R., & Galea, S. (2018). Precision Medicine from a Public Health Perspective. *Annual Review of Public Health*, *39*, 153–168. https://doi.org/10.1146/annurev-publhealth-040617-014158

Reyes-Peces, M. V., Pérez-Moreno, A., de-Los-Santos, D. M., Mesa-Díaz, M. del M., Pinaglia-Tobaruela, G., Vilches-Pérez, J. I., Fernández-Montesinos, R., Salido, M., de la Rosa-Fox, N., & Piñero, M. (2020). Chitosan-GPTMS-silica hybrid mesoporous aerogels for bone tissue engineering. *Polymers*, *12*(11), 2723.

Russell, W. M. S., & Burch, R. L. (1959). *The principles of humane experimental technique*. Methuen.

Sara Mantero, Andrea Remuzzi, Manuela T. Raimondi, & Arti Ahluwalia. (2022). *Fondamenti di ingegneria dei tessuti per la medicina rigenerativa* (Pàtron, Ed.). https://re.public.polimi.it/handle/11311/567134

Schimek, K., Frentzel, S., Luettich, K., Bovard, D., Rütschle, I., Boden, L., Rambo, F., Erfurth, H., Dehne, E.-M., Winter, A., Marx, U., & Hoeng, J. (2020). Human multi-organ chip co-culture of bronchial lung culture and liver spheroids for substance exposure studies. *Scientific Reports*, *10*(1), 7865. https://doi.org/10.1038/s41598-020-64219-6

Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceri, & K. W. (2012). *NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis—PubMed*. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22930834/

Schnell, U., Dijk, F., Sjollema, K. A., & Giepmans, B. N. (2012). Immunolabeling artifacts and the need for live-cell imaging. *Nature Methods*, *9*(2), 152–158.

Siddiqui, N., Asawa, S., Birru, B., Baadhe, R., & Rao, S. (2018). PCL-based composite scaffold matrices for tissue engineering applications. *Molecular Biotechnology*, *60*(7), 506–532.

Surolia, R., Li, F. J., Wang, Z., Li, H., Liu, G., Zhou, Y., Luckhardt, T., Bae, S., Liu, R., & Rangarajan, S. (2017). 3D pulmospheres serve as a personalized and predictive multicellular model for assessment of antifibrotic drugs. *JCI Insight*, *2*(2), Article 2.

Tenenbaum-Katan, J., Artzy-Schnirman, A., Fishler, R., Korin, N., & Sznitman, J. (2018). Biomimetics of the pulmonary environment in vitro: A microfluidics perspective. *Biomicrofluidics*, *12*(4), 042209.

The alveolus-on-a-chip: A biomimetic, microfluidic in vitro model of the alveolar-capillary barrier—Webthesis. (n.d.). Retrieved July 3, 2022, from https://webthesis.biblio.polito.it/19618/

Tonda-Turo, C., Cipriani, E., Gnavi, S., Chiono, V., Mattu, C., Gentile, P., Perroteau, I., Zanetti, M., & Ciardelli, G. (2013). Crosslinked gelatin nanofibres: Preparation, characterisation and in vitro studies using glial-like cells. *Materials Science and Engineering: C*, *33*(5), 2723–2735.

Tonda-Turo, C., Gentile, P., Saracino, S., Chiono, V., Nandagiri, V. K., Muzio, G., Canuto, R. A., & Ciardelli, G. (2011). Comparative analysis of gelatin scaffolds crosslinked by genipin and silane coupling agent. *International Journal of Biological Macromolecules*, *49*(4), 700–706.

Transwell® Permeable Supports | Guidelines for Use | Corning. (n.d.). Retrieved June 22, 2022, from https://www.corning.com/worldwide/en/products/life-sciences/products/permeable-supports/transwell-guidelines.html

Waugh CA, A. kC. (2022, June 20). *Expanding the 3R principles: More rigour and transparency in research using animals—PubMed*. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28743713/

Xue, J., Shi, R., Niu, Y., Gong, M., Coates, P., Crawford, A., Chen, D., Tian, W., & Zhang, L. (2015). Fabrication of drug-loaded anti-infective guided tissue regeneration membrane with adjustable biodegradation property. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *135*, 846–854.

Yoshihara, M., Oguchi, A., & Murakawa, Y. (2019). Genomic instability of iPSCs and challenges in their clinical applications. *Stem Cells*, 23–47.

Yuan, H., Xing, K., & Hsu, H.-Y. (2018). Trinity of Three-Dimensional (3D) Scaffold, Vibration, and 3D Printing on Cell Culture Application: A Systematic Review and Indicating Future Direction. *Bioengineering*, *5*(3), 57. https://doi.org/10.3390/bioengineering5030057

Zamprogno, P., Wüthrich, S., Achenbach, S., Thoma, G., Stucki, J. D., Hobi, N., Schneider-Daum, N., Lehr, C.-M., Huwer, H., & Geiser, T. (2021). Second-generation lung-on-a-chip with an array of stretchable alveoli made with a biological membrane. *Communications Biology*, *4*(1), 1–10.

Zavan, B., Gardin, C., Guarino, V., Rocca, T., Cruz Maya, I., Zanotti, F., Ferroni, L., Brunello, G., Chachques, J.-C., & Ambrosio, L. (2021). Electrospun PCL-based vascular grafts: In vitro tests. *Nanomaterials*, *11*(3), 751.

Zhang, M., Xu, C., Jiang, L., & Qin, J. (2018). A 3D human lung-on-a-chip model for nanotoxicity testing. *Toxicology Research*, *7*(6), 1048–1060.

Zhang, Y., Lu, P., Sun, Q., Li, T., Zhao, L., Gao, X., Wang, F., & Liu, J. (2018). Lipase-mediated direct in situ ring-opening polymerization of ε-caprolactone formed by a chemo-enzymatic method. *Journal of Biotechnology*, *281*, 74–80.

RINGRAZIAMENTI

Vorrei ringraziare il Politecnico di Torino per avermi concesso l'opportunità di svolgere questo elaborato di tesi, che è stato per me una grande opportunità di crescita personale e professionale. Inoltre, vorrei ringraziare la mia Università per avermi dato l'opportunità di crescere nell'arco di questi cinque anni mettendomi alla prova ed aiutandomi a forgiare la mia forza e la mia costanza nel lavoro. Un grande ringraziamento va ai miei relatori che mi hanno aiutato molto nel corso di questo lavoro e sono stati sempre presenti e disponibili con me. Grazie ai ragazzi di IVTech, Daniele e Tommaso, con cui abbiamo collaborato in questi mesi e che sono sempre stati presenti e a gentilissimi sia nel darmi l'opportunità di svolgere parte del mio lavoro presso la loro azienda sia nell'assisterci a distanza nel risolvere ogni problema.

Grazie di cuore a tutti i miei amici, che ho conosciuto durante questo bellissimo viaggio; con loro ho condiviso momenti bellissimi, e con loro spesso sono riuscito a superare alcuni momenti in cui mi sono sentito solo e sconfortato quando le cose andavano male, e ciò rende il traguardo raggiunto ancora più prezioso.

Un infinito ringraziamento va alla mia famiglia, mi siete sempre stati vicini, soprattutto nei momenti più bui in cui volevo mollare. Cari mamma e babbo, voi avete sempre creduto in me e mi avete sempre dato tutto il vostro supporto, vi voglio un bene infinito senza la vostra forza ed il vostro amore non sarei mai arrivato a questo punto. Vorrei ringraziare mio fratello Alessandro; insieme abbiamo condiviso la vita torinese per i miei primi anni di Università, durante i quali abbiamo riso nei momenti più belli ma anche pianto in quelli più difficili. Ci siamo sempre sostenuti l'uno con l'altro per raggiungere i nostri traguardi grazie al nostro rapporto sempre sincero e forte, e ora, anche se più distanti fisicamente, il nostro legame si è rafforzato ancora di più. Sei sempre stato una guida per me e il traguardo che ho raggiunto oggi è merito della forza che mi hai ispirato. Un ringraziamento speciale va allo zio Diego, che con la sua allegria mi ha sempre aiutato ad andare avanti, e mi ha donato gioia ed energia anche nei momenti di maggiore fatica. Un grazie al mio amato nonno, che purtroppo oggi non c'è più; sei sempre stato orgoglioso del mio percorso ed entrambi ci tenevamo tanto a condividere questo giorno insieme, ma anche se oggi non sei qui con noi so che comunque, anche tu, da lassù ti stai godendo questo splendido momento. In fine a voi tutti ci tengo a dirvi grazie con tutto il mio cuore perché la persona che sono ed il traguardo raggiunto è frutto di tutto quello che mi avete insegnato e del vostro

sostegno, conseguenza di un legame indissolubile, forte e sincero, che mi ha permesso di superare me stesso e mi sta permettendo di crescere ogni giorno. Un grande grazie a Chiara, con Ale mi avete sempre ospitato in quest'ultimo periodo, e mi avete aiutato tanto non lasciandomi mai solo e aiutandomi ad allontanare la tensione del momento. Siete per me un emblema di quella che è una vera famiglia, spensierata e felice grazie per tutto quello che avete fatto, da queste piccole cose, che apprezzo tantissimo, si vede l'unità e la bellezza del legame forte e sincero che abbiamo.

Grazie infinito ed immenso ad Erica. Nonostante tutto, mi hai sempre dato forza e supportato e mi hai aiutato a crescere sotto tutti i punti di vista. Nei giorni più bui non mi hai fatto mai sentire solo, tu ci sei sempre stata e mi hai sempre regalato un sorriso, con quella tua solarità che darebbe energia anche al Sole. Mi hai aiutato molto con la mia tesi, anche quando siamo stati lontani hai sempre ritagliato del tempo per ascoltarmi. Sei unica e speciale, hai un cuore immenso e vuoi sempre dare il meglio alle persone a cui tieni. Io non smetterò mai di ringraziare Dio e l'universo per avermi donato la fortuna di incontrarti ed entrare nella tua vita. Mi sento l'uomo più felice e orgoglioso su questo mondo per la fortuna che ho nel raggiungere un traguardo per me così importante con a fianco una persona come te. Ti amo amore mio, sei la certezza del mio futuro che si fa sempre più nitido e certo insieme a te.

Voglio dire grazie al mio carissimo amico Cristiano, o meglio "L'Avvocato", tu hai spesso gioito prima di me per un esame andato bene, con te ho condiviso la gioia della mia prima lode della triennale. Sei un amico unico con cui ho condiviso solo momenti bellissimi e anche se distanti la nostra amicizia si è sempre fatta più forte, ogni volta che sono tornato a casa o sono ripartito per Torino sei sempre stato lì o per ridere insieme o per fare coraggio. La tua calcolatrice mi ha regalato tanta fortuna ad ogni esame e mi ha permesso di portarti lì con me aiutandomi a non essere ansioso richiamandomi alla mente i momenti scherzosi passati insieme.

Un grande grazie va anche al mio amico, Pino; tu mi hai insegnato l'arte della corsa che mi ha aiutato spesso a scaricare lo stress ed il nervosismo che accumulavo durante le sessioni d'esame; i nostri allenamenti insieme li conservo gelosamente nel cassetto del mio cuore, perché in ognuno di questi mi hai dato motivazione e forza per continuare i miei studi, soprattutto mi hai incitato ad andare avanti quando ti parlavo di sessioni andate storte, ogni telefonata e chiacchierata con te è sempre stata piacevole come dimostrato dal numero di risate che abbiamo fatto.

In fine, un grazie speciale va a me stesso, che con umiltà e dedizione ho sempre continuato ad andare avanti ascoltando i consigli e le critiche costruttive da chi mi è stato vicino. Ho sempre lavorato con costanza e cercato di dare il meglio di me, sono arrivato alla fine di questo percorso cresciuto e maturato, so che ci sono ancora traguardi di miglioramento da raggiungere, e su questa strada nel prossimo futuro cercherò di raggiungerli e superarli, guidato dalla mia personalità e dalla fiducia di chi mi ha sempre sostenuto.