

POLITECNICO DI TORINO

Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica



Tesi di Laurea Magistrale

Sintesi e caratterizzazione di bioinchiostri a base di collagene cellularizzati con fibroblasti derivati dallo stroma della parete alveolo-capillare

Relatori

Prof. Gianluca CIARDELLI

Dott.ssa Chiara TONDA-TURO

Correlatore

Dott.ssa Michela LICCIARDELLO

Candidata

Myriam CARDILLO

Dicembre 2021

Sommario

Lung diseases are one of the main causes of death worldwide. Animal and *in vitro* models are used to understand lung development, physiology and pathologies, and to evaluate the efficiency and toxicity of drugs. However, the physiological differences between animals and humans involve both limits in reproducing all the characteristics observed in humans, and different responses to drugs. Instead, *in vitro* models synthesize more accurately the complexity of human biology and offer tightly controlled cell environments. For this reason, attention has increased towards new tissue engineering techniques that are exploited in order to obtain realistic and biomimetic lung models. One possible approach is the 3D bioprinting technique, as it has many advantages over traditional methods, including co-printing materials and cells in a multilayer form to create constructs with specific biochemical, biomechanical and physiological properties. The present thesis work aims to create an *in vitro* model of lung using the 3D bioprinting technique, using a type I collagen based on hydrogels as the printing material, being the most abundant protein in lung tissue. Furthermore, the use of collagen-based hydrogels allows to recreate a three-dimensional environment very similar to the extracellular matrix observed *in vivo*, both from a structural point of view and from a biofunctional one. Collagen is a structural protein made up of triple helices that self-assemble according to a process known as fibrillogenesis. This process leads to the formation of fibrils, which in turn organize themselves into fibers. *In vitro*, this phenomenon is influenced by various parameters such as the concentration of collagen, the ionic strength, the pH and the temperature of the solution. In this thesis work, collagen-based hydrogels were obtained at a concentration of 2

% w / v, in which the fibrillogenesis process is induced by exploiting the pH and temperature. The phenomenon of fibrillogenesis was initially studied using the turbidity method. In addition, fluorescence spectroscopy was used to monitor the formation of fibrils, using thioflavin T, a fluorescent dye from the benzothiazole family. Subsequently, rheological tests were carried out to evaluate the physical and mechanical properties of the collagen-based hydrogel. However, hydrogels have poor mechanical properties and poor stability in a physiological environment. For this reason, to improve its mechanical stability and reduce the degradation rate, riboflavin (RF), a biocompatible vitamin B2, used as a photosensitizer for the photoreticulation of the hydrogel scaffold, was added to the collagen solution. Finally, the hydrogel was loaded with human MRC-5 fibroblasts derived from the stroma of the alveolum-capillary wall. Initially, different cell densities were evaluated in order to choose the most suitable. The vitality of the cells within the collagen hydrogels was demonstrated through the cell titer blue and LIVE / DEAD tests. Finally, preliminary printing tests were performed which demonstrated the stability of the hydrogel and its potential as a bio-ink to obtain cellularized 3D structures.

Indice

Elenco delle tabelle	VIII
Elenco delle figure	IX
Acronimi	XV
1 Introduzione	1
1.1 Problemi clinici	1
1.2 Overview del sistema respiratorio	2
1.2.1 Funzioni	2
1.2.2 Organizzazione del sistema respiratorio	3
1.2.3 Respirazione esterna ed interna	3
1.2.4 Polmoni	4
1.2.5 Zona respiratoria	5
1.3 Modelli di organo	8
1.3.1 Modelli <i>in vivo</i>	9
1.3.2 Modelli <i>in vitro</i>	10
1.4 Ingegneria tissutale	17
1.5 3D Bioprinting	20
1.5.1 Bioink	21
1.5.2 Tecniche di stampa 3D	22
1.5.3 Fabbricazione assistita da PC	24
1.6 Idrogeli	25
1.6.1 Definizione e proprietà	25

1.6.2	Meccanismo di cross-linking degli idrogeli	27
1.7	Collagene	27
1.7.1	Definizione e struttura	27
1.7.2	Self-assembly del collagene	29
1.7.3	Proprietà: fibrillogenesi	31
1.7.4	Thioflavina (ThT)	34
1.7.5	Riboflavina	37
2	Scopo della tesi	51
3	Materiali e metodi	53
3.1	Soluzione di collagene	53
3.1.1	Componenti della soluzione	53
3.1.2	Preparazione della soluzione a base di collagene	55
3.2	Caratterizzazione soluzione di collagene	57
3.2.1	<i>Swelling</i>	57
3.2.2	Componenti della soluzione a base di collagene e thioflavina	58
3.2.3	Protocollo soluzione di lavoro collagene-ThT	59
3.2.4	Lettore di micropiastre	61
3.2.5	Misurazioni di <i>turbidity</i>	62
3.2.6	Componenti della soluzione a base di collagene e riboflavina	63
3.2.7	Protocollo soluzioni di lavoro collagene-RF	64
3.2.8	Reometro	65
3.3	Cellularizzazione del bioinchiostro	68
3.3.1	Colture cellulari: MRC-5	68
3.3.2	Materiali e strumenti per le colture cellulari	69
3.3.3	Procedura di trattamento delle colture cellulari	74
3.3.4	Procedura di subcoltura	76
3.3.5	Cellularizzazione dell'idrogelo a base di collagene	77
3.3.6	Saggio di vitalità cellulare	78
3.4	Bioprinting idrogelo a base di collagene	79
3.4.1	Stampante	79

3.4.2	Realizzazione del modello	80
4	Risultati	86
4.1	<i>Swelling</i>	86
4.2	Esperimento di <i>turbidity</i>	88
4.3	Spettro di emissione in fluorescenza	89
4.4	Prove con il reometro	90
4.5	3D Bioprinting	96
4.5.1	Primo metodo di stampa	96
4.5.2	Secondo metodo di stampa	97
4.6	Vitalità cellulare	98
5	Conclusioni e sviluppi futuri	100
5.1	Conclusioni	100
5.2	Sviluppi futuri	103
5.2.1	Approccio di stampa	103
5.2.2	Cellularizzazione del bioinchiostro	104
	Bibliografia	111

Elenco delle tabelle

1.1	Differenze tra i modelli di coltura 2D e 3D [12][14].	15
1.2	Fonti cellulari per l'ingegneria tissutale [25][28].	19
1.4	Proprietà ideali degli idrogeli per bioprinting [35].	26
1.5	Valori di controllo del modulo di Young, costrutti di collagene reticolati con RF (15 min esposti alla lampada di attivazione) e reticolati con RF (esposto a luce bianca). Valori del modulo di Young dello scaffold in collagene reticolato prima o dopo la fase di compressione plastica [50].	40
1.6	Moduli elastici degli idrogel HC e FDC variando la concentrazione di collagene e il tempo di esposizione ai raggi UV [48].	44
1.3	Principali tecniche di stampa 3D nell'ingegneria tissutale [30][31][33].	50
3.1	Polvere di collagene di tipo I, descrizione del prodotto [52].	53
3.2	MEM, descrizione del prodotto [53].	54
3.3	Acido Acetico, descrizione del prodotto [55].	55
3.4	Idrossido di sodio, descrizione del prodotto [56].	55
3.5	Thioflavina T, descrizione del prodotto [57].	59
3.6	Riboflavina, descrizione del prodotto [59].	63
3.7	MRC-5, descrizione del prodotto [61].	69
3.8	DMSO, descrizione del prodotto [62].	70
3.9	FBS, descrizione del prodotto [63].	70
3.10	Penicillina/Streptomina, descrizione del prodotto [64].	71
3.11	Tripsina, descrizione del prodotto [65].	72

Elenco delle figure

1.1	Sistema respiratorio [4].	4
1.2	Membrana alveolo-capillare. Cellula ATI: cellula epiteliale alveolare di tipo I, cellula ATII: cellula epiteliale alveolare di tipo II [9] . . .	7
1.3	Strategia dell'ingegneria tissutale.	21
1.4	Schema delle strategie di 3D bioprinting più comunemente utilizzate nell'ingegneria dei tessuti [31].	24
1.5	Struttura gerarchica del collagene [37].	29
1.6	Schema del processo di self-assembly del collagene [39].	31
1.7	Eventi extracellulari nella sintesi delle fibrille di collagene [38]. . .	33
1.8	Vie per ottenere la fibrillogenesi del collagene <i>in vitro</i> [43].	34
1.9	Spettri di emissione di fluorescenza di ThT, PSC e PSC/ThT. La curva "a" rappresenta la fluorescenza di PSC/Th-T assemblati; curva "b" quella di PSC/ThT dissociati; curva "c" quella di PSC/ThT; curva "d" quella di ThT; curva "e" quella di PSC; curva "f" quella del PSC assemblato [45].	36
1.10	(A) Curve torbidità-tempo (assorbanza a 310 nm) di PSC e PSC/-ThT. (B) Curva di evoluzione dell'intensità di fluorescenza di PSC/-ThT nel processo di autoassemblaggio [45].	37

1.11 a) Valori di controllo del modulo di Young, costrutti di collagene reticolati con RF (15 min esposti alla lampada di attivazione) e reticolati con RF (esposto a luce bianca). b) Valori del modulo di Young dello scaffold in collagene reticolato prima o dopo la fase di compressione plastica. Le barre di errore rappresentano la deviazione standard sul valore medio ($P < 0,05$) [50].	41
1.12 Test meccanici su idrogel di collagene-RF: influenza della concentrazione di collagene, dell'esposizione ai raggi UV e della liofilizzazione [48].	45
1.13 Risultati rappresentativi dei test reologici del bioink di collagene con riboflavina [51].	47
1.14 Proprietà reologiche dei bioink di collagene prima, durante e dopo l'esposizione ai raggi UV, con e senza riboflavina. (A) G' di bioink prima dell'esposizione ai raggi UV. (B) G' di bioink dopo 10 s di esposizione alla luce UV [51].	49
3.1 Preparazione della soluzione a base di collagene. Rappresentazione schematica dei passaggi operativi effettuati e degli strumenti e materiali utilizzati.	56
3.2 Neutralizzazione della soluzione a base di collagene	57
3.3 Immagine relativa ai 3 campioni di collagene dopo la transizione in gel e l'aggiunta di PBS.	58
3.4 Preparazione della soluzione di tioflavina alla concentrazione di 0.5 mM. Rappresentazione schematica dei passaggi operativi effettuati e degli strumenti e materiali utilizzati.	60
3.5 Soluzione di collagene e tioflavina, a pH acido, prima della centrifugazione.	60
3.6 Soluzione di collagene e tioflavina, a pH acido, dopo la centrifugazione.	60
3.7 Lettore di micropiastre multimodale Varioskan LUX di Thermo Scientific.	62
3.8 Lettura dello spettro di assorbanza della soluzione di collagene con il lettore di micropiastre multimode ad assorbanza.	62

3.9	Preparazione della soluzione di riboflavina al 2 % w/v. Rappresentazione schematica dei passaggi operativi effettuati e degli strumenti e materiali utilizzati.	64
3.10	Preparazione della soluzione a base di collagene e riboflavina. Neutralizzazione della soluzione.	65
3.11	Reometro MCR SERIES ANTON PAAR [60].	66
3.12	Visualizzazione al microscopio della linea cellulare MRC-5. Le due immagini rappresentano le cellule a diversi giorni di coltura [61] . .	68
3.13	Centrifuga.	73
3.14	Microscopio ottico invertito.	73
3.15	Camera di Burker.	74
3.16	Procedura trattamento delle cellule.	76
3.17	Rappresentazione schematica dei passaggi da effettuare per la subcoltura cellulare.	77
3.18	Stampante 3D Discovery, RegenHU.	79
3.19	Modulo 1 per la stampa di idrogeli cellularizzati.	80
3.20	Disegno del modello CAD e impostazione dei parametri di stampa.	81
3.21	Anteprima del modello CAD.	82
3.22	<i>G-Code</i> e software della stampante 3D.	82
3.23	Dispositivi per il controllo manuale dalla temperatura e della pressione di stampa.	83
3.24	Modulo 1.	84
3.25	Soluzione di collagene prima della centrifugazione.	84
3.26	Soluzione di collagene dopo la centrifugazione.	84
4.1	Grafico relativo allo <i>swelling</i> percentuale.	87
4.2	Curva turbidity-tempo della soluzione di collagene a pH 7 con assorbanza a 310 <i>nm</i>	88
4.3	Spettri di emissione in fluorescenza delle soluzioni di collagene, ThT/collagene e ThT in DMEM e acido acetico, al variare del pH.	90

4.4	Grafico relativo alle prove di time dei campioni a diverse concentrazioni di collagene.	92
4.5	Valutazione dell'influenza della riboflavina sul processo di fibrillogenesi del collagene e sulle sue proprietà meccaniche. Grafico relativo alle prove di time dei campioni di collagene e riboflavina alla concentrazione di 0.5 <i>mM</i>	93
4.6	Grafico relativo alle prove di strain effettuate a 25°C sui campione di collagene alle concentrazioni 1 % w/v e 1.5 % w/v.	94
4.7	Grafico relativo alle prove di strain, effettuate alla temperatura ambiente, sui campione di collagene e riboflavina 0.5 <i>mM</i>	95
4.8	Grafico relativo alla prova di frequency effettuata sul campione con concentrazione di collagene pari all'1 % w/v.	95
4.9	Modelli 3D ottenuti con il primo metodo di stampa.	96
4.10	Modelli 3D stampati con il secondo metodo di stampa.	97
4.11	Vitalità della linea cellulare MRC-5 all'interno dell'idrogelo di collagene dopo 48 <i>h</i>	98
4.12	Vitalità della linea cellulare MRC-5 all'interno dell'idrogelo di collagene dopo 72 <i>h</i>	99
5.1	Risultati rappresentativi dei test reologici di bioinchiostri di collagene da 8 mg/ml [70].	105
5.2	Proprietà reologiche dei bioink di collagene prima, durante e dopo la gelificazione indotta dalla temperatura con densità cellulari di 0, 5, 10, 25 e 100 milioni di cellule/ml. (A) G' del bioink a 4 ° C prima della gelificazione. (B) G' del bioink dopo completa gelificazione a 37 ° C. (C) Tasso di crescita massimo di G' dopo che la temperatura è stata aumentata a 37 °C. (D) Tempo di crossover di G' dopo che la temperatura è stata aumentata a 37 ° C [70].	106
5.3	Vitalità dei condrociti nei costrutti biostampati di collagene dopo la biostampa. Tutti i campioni sono stati fabbricati utilizzando bioinchiostri al collagene con 10 milioni di cellule/ml [70].	108

5.4	Vitalità dei condrociti negli idrogeli di collagene con e senza la reticolazione della riboflavina [51].	109
-----	--	-----

Acronimi

ATP

Adenosina trifosfato

ATI

Cellula epiteliale alveolare di tipo I

ATII

Cellula epiteliale alveolare di tipo II

ECM

Matrice extracellulare

2D

2-Dimesioni

3D

3-Dimensioni

MMP

Metalloproteinasi della matrice

PDMS

Polidimetilsilossano

TE

Ingegneria dei tessuti

GF

Fattori di crescita

ESC

Cellule staminali embrionali

ASC

Cellule staminali adulte

iPSC

Cellule staminali pluripotenti indotte

AM

Produzione additiva

UV

Radiazione ultravioletta

CAD

Progettazione assistita da computer

CAM

Fabbricazione assistita da computer

TC

Tomografia computerizzata

MRI

Risonanza magnetica

ThT

Thioflavina T

RF

Riboflavina

PSC

Collagene solubile in pepsina

FBS

Siero fetale bovino

PBS

Tampone fosfato salino

DMA

Analisi meccanica dinamica

HC

Idrogel di collagene idratato

FDC

Idrogel di collagene liofilizzato

MEM

Minimum Essential Medium

NaOH

Idrossido di sodio

DMSO

Dimetil-solfossido

LVE

Regione viscoelastica lineare

G'

Modulo elastico

G''

Modulo di perdita

Capitolo 1

Introduzione

1.1 Problemi clinici

La principale funzione del polmone è quella di supportare lo scambio di gas, di conseguenza, quando questa funzione è compromessa, sia a causa di difetti dello sviluppo che di malattie che colpiscono la struttura e la funzione del polmone stesso, le conseguenze possono essere gravi e spesso fatali [1].

Sia i modelli *in vivo* che quelli *in vitro* sono utilizzati per studiare l'evoluzione e il trattamento di patologie polmonari (come infezione, infiammazione e cancro), per la somministrazione di farmaci e per gli studi di tossicologia [2].

I modelli animali sono importanti per valutare l'efficienza dei farmaci sull'organismo e per la comprensione dello sviluppo, della fisiologia e delle malattie polmonari. Tuttavia, esistono differenze fondamentali nell'anatomia e nella fisiologia tra polmoni umani e quelli di animali. Queste differenze comportano sia dei limiti nel riprodurre tutte le caratteristiche osservate negli esseri umani, sia risposte differenti ai farmaci. Questo è evidenziato dal fatto che, ad esempio, l'80% dei farmaci che superano i test preclinici sui roditori, non riescono a trattare efficacemente le malattie umane durante gli studi clinici. Oltre alle differenze nella fisiologia polmonare e nelle risposte ai composti, i test sugli animali sono anche un argomento delicato da un punto di vista etico.

I modelli *in vitro* offrono ambienti cellulari strettamente controllati e facilmente

replicabili e consentendo la valutazione, l'efficienza e la tossicità dei farmaci. Inoltre, sintetizzano in modo più affidabile e accurato la complessità della biologia umana rispetto ai modelli animale, e quindi forniscono una miglior comprensione e capacità di trattare le malattie polmonari [1][2].

Per questo motivo, l'attenzione è aumentata verso nuove tecniche di ingegneria tissutale che vengono sfruttate al fine di ottenere modelli di polmone realistici e biomimetici.

In questo lavoro di tesi, viene utilizzato un idrogel a base di collagene di tipo I per sviluppare un modello di stroma della parete alveolo-capillare *in vitro* che potrà essere utilizzato per effettuare test sui farmaci *in vitro* e ridurre l'utilizzo di modelli animali per gli studi preclinici.

1.2 Overview del sistema respiratorio

1.2.1 Funzioni

La funzione principale dell'apparato respiratorio è di far penetrare nel nostro organismo l'ossigeno e di eliminare l'anidride carbonica: prodotto di scarto dell'attività delle cellule. Durante la respirazione possono essere evidenziati quattro principali processi:

1. *ventilazione polmonare*: ovvero il flusso di aria che entra (fase di inspirazione) ed esce (fase di espirazione) dai polmoni, con lo scopo di permettere il rinnovo continuo dei gas respiratori all'interno degli alveoli polmonari.
2. *Respirazione esterna*: questa fase riguarda lo scambio polmonare dei gas che avviene tra il sangue dei capillari polmonari e l'aria degli alveoli polmonari.
3. *Trasporto di gas*: durante questo processo l'ossigeno e l'anidride carbonica vengono trasportati dai tessuti ai polmoni e dai polmoni ai tessuti per mezzo del circolo sanguigno.
4. *Respirazione interna*: è la fase che coinvolge lo scambio dei gas tra il sangue dei capillari sistemici e le cellule dei tessuti.

Poiché l'ossigeno e l'anidride carbonica vengono trasportati in tutto il corpo nel sangue, una respirazione efficace dipende anche da un sistema cardiovascolare perfettamente funzionante [3].

1.2.2 Organizzazione del sistema respiratorio

Come si osserva nella Figura 1.1, l'apparato respiratorio è costituito dalle vie aeree e dai polmoni. Le vie aeree si dividono in:

- *vie aeree superiori*: costituite da organi collocati esternamente al torace, quali naso, faringe e laringe;
- *vie aeree inferiori*: che comprendono organi posti all'interno del torace, quali trachea, bronchi e polmoni.

Un'ulteriore distinzione la si può fare tra:

- *zona di conduzione*: consente la conduzione dell'aria dalla laringe ai polmoni;
- *zona respiratoria*: comprende i siti di scambio dei gas che si trovano nei polmoni.

Attraverso le vie di conduzione l'aria viene umidificata, riscaldata e filtrata. La principale differenza anatomica la zona di conduzione e quella di respirazione consiste nello spessore delle pareti che costituiscono gli spazi aerei: solo gli spazi aerei delimitati da pareti sufficientemente sottili possono partecipare agli scambi di gas [3].

1.2.3 Respirazione esterna ed interna

Lo scambio dei gas avviene a due livelli distinti, chiamati respirazione esterna e respirazione interna.

- La **respirazione esterna** è la diffusione dell'ossigeno dagli alveoli nella circolazione polmonare e la diffusione dell'anidride carbonica nella direzione opposta. La diffusione si verifica perché le molecole di gas si spostano sempre da aree ad alta concentrazione a bassa concentrazione.

- La **respirazione interna** (o respirazione cellulare) descrive lo scambio di ossigeno e anidride carbonica tra il sangue e le cellule dei tessuti. Le cellule utilizzano l'ossigeno durante la produzione della loro principale fonte di energia, l'adenosina trifosfato (ATP) e producono anidride carbonica come prodotto di scarto [3].

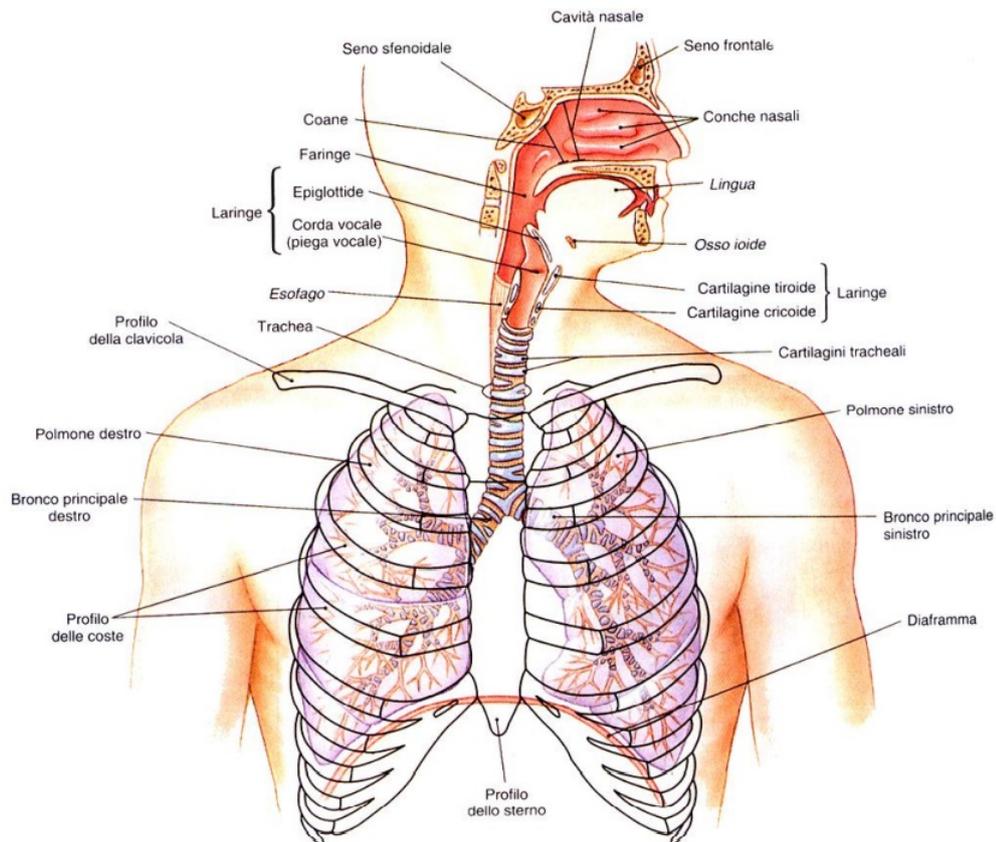


Figura 1.1: Sistema respiratorio [4].

1.2.4 Polmoni

I polmoni, gli organi principali dell'apparato respirato, si trovano nella cavità toracica. Ciascun polmone è diviso in regioni distinte chiamate lobi; il polmone destro è composto da tre lobi e quello sinistro da due lobi. Essi hanno la capacità di espandersi e rilassarsi seguendo ai movimenti della gabbia toracica stessa e del

diaframma.

I polmoni sono costituiti da un tessuto spugnoso ed elastico, che consente loro di adattarsi alle variazioni di volume indotte dai movimenti respiratori. La parete toracica è composta da strutture che proteggono i polmoni, quali la gabbia toracica, lo sterno, le vertebre toraciche, i muscoli e i tessuti connettivi associati. I muscoli della parete toracica responsabili della respirazione sono i muscoli intercostali interni ed esterni e il diaframma, che delimita inferiormente la parete toracica e addominale. L'aria entra ed esce dai polmoni attraverso le vie aeree superiori e una rete di condotti che formano un sistema di passaggi chiamato tratto respiratorio [5].

Pleura

La superficie interna della parete toracica e la superficie esterna dei polmoni sono coperte da una membrana chiamata pleura, formata da uno strato di cellule epiteliali e da tessuto connettivo. Inoltre, ciascun polmone è ricoperto da un proprio distinto sacco pleurico. La porzione di sacco pleurico attaccata alla parete toracica viene chiamata pleura parietale, mentre la porzione attaccata al tessuto polmonare viene chiamata pleura viscerale. Tra le due pleure si trova un compartimento molto sottile, chiamato spazio intrapleurico, il quale è riempito da una piccola quantità di liquido intrapleurico [5]. Ciò riduce l'attrito tra le due pleure, consentendo ai due strati di scorrere l'uno sull'altro durante la respirazione [3].

1.2.5 Zona respiratoria

La trachea, all'interno della cavità toracica, si divide nei bronchi primari di destra e di sinistra che conducono l'aria in ciascun polmone. I bronchi sono costituiti da anelli di cartilagine per la loro intera circonferenza. All'interno dei polmoni, avviene la divisione dei bronchi primari in bronchi secondari. Di questi, tre conducono l'aria ai lobi del polmone destro e due conducono aria ai lobi del polmone sinistro [5]. Ciascun bronco secondario, a sua volta si divide in bronchi terziari più piccoli, che si ramificano ulteriormente in bronchi ancora più piccoli. Quando i tubuli hanno un diametro minore di un millimetro, questi prendono il nome di bronchioli [5].

I bronchioli, a differenza dei bronchi, non contengono cartilagine, ma le loro pareti sono costituite da fibre elastiche per evitare il collasso. I bronchioli si dividono ulteriormente in bronchioli terminali, le componenti più piccole della zona di conduzione. Nella zona di conduzione non si verificano scambi di gas, ma essa costituisce una via di passaggio attraverso la quale l'aria può entrare ed uscire dalla zona respiratoria. La zona respiratoria, nella quale si verificano gli scambi gassosi, inizia dopo che i bronchioli terminali si ramificano [5]. Le prime strutture della zona respiratoria sono i bronchioli respiratori, che portano ai dotti alveolari, alle sacche alveolari e agli alveoli [3].

Alveoli

Gli alveoli, piccole sacche sferiche interconnesse, costituiscono la sede primaria in cui si verificano scambi dei gas tra l'aria e il sangue [6].

Come si può osservare nella Figura 1.2, l'epitelio degli alveoli è costituito da:

1. **Cellule alveolari di tipo I o pneumociti di tipo I**, grandi e piatte, che coprono circa il 95 % della superficie alveolare totale e sono disposte su una lamina basale. Queste cellule funzionano principalmente come una sottile membrana permeabile ai gas.
2. **Cellule di tipo II cuboidali**. La loro funzione più importante è la sintesi e la secrezione di tensioattivi. I tensioattivi polmonari sono una miscela complessa di proteine e fosfolipidi che riducono la tensione superficiale all'interfaccia aria-liquido e prevengono il collasso della superficie alveolare. Il rinnovamento e la riparazione sono forniti dalle cellule di tipo II che, oltre alla loro funzione secretoria, costituiscono la popolazione cellulare progenitrice dell'epitelio alveolare [6][7][8].
3. **Macrofagi alveolari**, i quali inglobano le particelle estranee e gli elementi patogeni inalati che giungono nei polmoni. Essi sono liberi di muoversi negli alveoli e una volta morti, la risalita del muco li porta alla faringe, per essere deglutiti insieme al muco stesso [5].

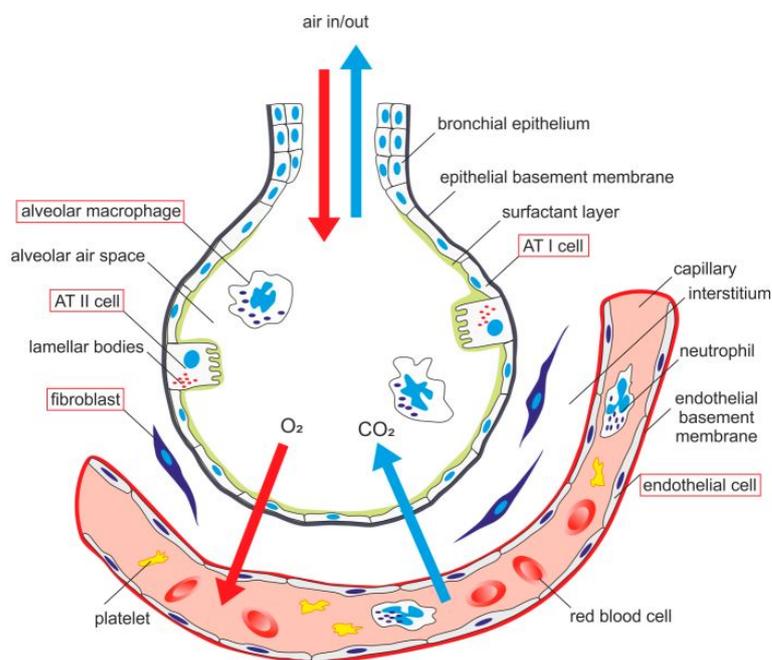


Figura 1.2: Membrana alveolo-capillare. Cellula ATI: cellula epiteliale alveolare di tipo I, cellula ATII: cellula epiteliale alveolare di tipo II [9]

Setto alveolare

Gli alveoli adiacenti sono separati da membrane, definite setti inter-alveolari. Il setto inter-alveolare è composto da due strati cellulari continui, che costituiscono la barriera tissutale all'interfaccia aria-sangue (barriera alveolo-capillare):

- Uno strato epiteliale sottile, rivolto verso il lume alveolare, costituito da cellule alveolari di tipo I e II e che consente la diffusione dei gas;
- Uno strato endoteliale rivolto verso il lume capillare.

Questi due strati sono separati da una membrana basale e da uno spazio interstiziale di vario spessore e composizione [7].

La membrana basale, composta da proteine della matrice extracellulare (ECM) tra cui collagene, elastina e proteoglicani, supporta le cellule epiteliali alveolari. La proteina più abbondante della membrana basale è il collagene, il quale svolge importanti funzioni come:

- mantenere l'integrità biologica e strutturale dell'ECM
- resistere ai carichi meccanici indotti dalla respirazione
- collegare la membrana basale dell'endotelio capillare con quella dell'epitelio alveolare nei punti in cui non appaiono fuse.

Lo spazio interstiziale è costituito da uno strato di tessuto connettivo all'interno del quale sono presenti i fibroblasti. Il loro ruolo è essenziale in tutte le fasi dello sviluppo polmonare e permettono di mantenere l'integrità strutturale del tessuto [10].

I fibroblasti possono differenziarsi in miofibroblasti durante la crescita o in seguito ad una lesione del tessuto polmonare [10]. Infatti, in seguito ad una lesione, i miofibroblasti migrano verso il sito del danno e sintetizzano le componenti della matrice extracellulare, con lo scopo di contribuire alla rigenerazione e al rimodellamento del tessuto. Inoltre, presentano proprietà contrattili e secretorie [11].

1.3 Modelli di organo

Le colture cellulari consentono di comprendere la biologia delle cellule, la morfologia dei tessuti, i meccanismi delle malattie e l'azione dei farmaci. A seconda del tipo di coltura scelta, il comportamento delle cellule differisce sotto molti aspetti [12]. La maggior parte degli studi sulle colture cellulari sono stati eseguiti utilizzando superfici bidimensionali (2D), come micropiastre, piastre Petri e fiasche per colture tissutali, in quanto sono facili da utilizzare, pratiche e presentano un'elevata vitalità cellulare. Tuttavia, all'interno del corpo umano, le cellule sono immerse in una matrice extracellulare, un complesso reticolo tridimensionale (3D) costituito da un'ampia distribuzione di fibre e spazi vuoti che forniscono segnali fisici e biochimici. Per questo motivo, le superfici bidimensionali presentano dei limiti nel riprodurre questi complessi microambienti 3D, e questi possono alterare il metabolismo cellulare e ridurre la funzionalità delle cellule [13].

Negli ultimi anni, per superare i limiti delle colture cellulari 2D, sono stati sviluppati una varietà di sistemi di coltura cellulare 3D per la scoperta di farmaci, per

studiare la biologia delle cellule tumorali, per lo studio delle cellule staminali e per i tessuti funzionali ingegnerizzati per l'impianto, e per altre analisi cellulari. Tali sistemi 3D rappresentano in modo più accurato l'effettivo microambiente in cui le cellule risiedono. Pertanto, il comportamento delle cellule coltivate in 3D riflette maggiormente le risposte cellulari *in vivo* rispetto alle colture 2D [14].

Di seguito, vengono descritte le caratteristiche dei modelli animali e dei modelli bidimensionali (2D), evidenziando vantaggi e limiti associati al loro utilizzo. Successivamente, si parlerà più nel dettaglio dei modelli tridimensionali (3D), con i loro vantaggi e svantaggi, in quanto rappresentano in modo più accurato le condizioni *in vivo*, e quindi sono maggiormente utilizzati per la modellazione degli organi.

1.3.1 Modelli *in vivo*

Resta una questione controversa l'utilizzo di modelli animali per prevedere la risposta umana ai farmaci e ad altre sostanze chimiche, nonché per la comprensione dello sviluppo, della fisiologia e delle malattie polmonari.

Esistono leggi nazionali e internazionali che regolano l'utilizzo di modelli animali nella ricerca, tutte basate sul principio delle 3R:

1. **Sostituzione:** fa riferimento a metodi che evitano o sostituiscono l'uso di animali. Questi possono essere metodi *in silico* (programmi informatici), metodi *in vitro* o relativa sostituzione (ad esempio, invertebrati, come moscerini della frutta) [15].
2. **Riduzione:** si riferisce a metodi che consentono ai ricercatori di ottenere livelli comparabili di informazioni da un numero inferiore di animali, riducendo così al minimo l'utilizzo di animali (ad es. moderne tecniche di imaging, condivisione di dati e risorse) [15].
3. **Perfezionamento:** si riferisce ai miglioramenti nelle procedure, che riducono al minimo il dolore, la sofferenza e l'angoscia e consentono un miglioramento generale del benessere dell'animale (ad es. miglioramento delle condizioni di vita di animali da ricerca, anestesia e analgesia per alleviare il dolore) [15].

Limiti

Tuttavia, esistono differenze fondamentali nell'anatomia e nella fisiologia degli esseri umani e degli animali. Queste differenze non consentono di riprodurre completamente tutte le caratteristiche osservate negli esseri umani e di prevedere in modo corretto gli esiti tossicologici e farmacologici umani tramite dei modelli animali [10]. Dunque, vi è la necessità di realizzare dei modelli più rappresentativi della biologia umana, che consentano una miglior comprensione e capacità di trattare le malattie polmonari [1].

Inoltre, gli oppositori affermano che i modelli animali spesso non generano benefici adeguati per quanto riguarda i loro potenziali rischi e danni e, di conseguenza, sono spesso eticamente non ammissibili. Sebbene si stiano studiando simulazioni numeriche e modelli al computer per ridurre l'utilizzo di animali nella ricerca, questi non sono ancora adeguati per sostituire totalmente la sperimentazione sugli animali a causa della complessità dei sistemi anatomici umani. Pertanto, i modelli animali rimangono una parte fondamentale degli studi preclinici e precedono l'utilizzo clinico di costrutti di ingegneria tissutale. Ciò può in parte giustificare un loro impiego nonostante siano essi associati a maggiori problematiche economiche e di gestione [16][17].

1.3.2 Modelli *in vitro*

Modelli di colture cellulari 2D

I modelli di colture cellulari 2D sono utilizzati per comprendere gli aspetti cellulari e biochimici relativi a determinate malattie e per verificare l'azione dei farmaci sul corpo umano.

I vantaggi delle colture 2D sono associati alla manutenzione semplice ed economica della coltura cellulare e all'esecuzione di test funzionali [12]. Nelle colture monostrate 2D, le cellule crescono su una superficie piana come micropiastre, piastre Petri e fiasche per colture tissutali. Tale organizzazione consente a tutte le cellule di ricevere dal mezzo una quantità omogenea di nutrienti e fattori di crescita.

Le cellule delle colture 2D sono generalmente piatte e allungate, e quindi presentano

una morfologia differente rispetto alle cellule coltivate *in vivo*. Questo influenza molti processi, quali la proliferazione cellulare, la differenziazione, l'apoptosi e l'espressione genica e proteica. Di conseguenza, le cellule coltivate in ambienti 2D potrebbero presentare un comportamento diverso rispetto a quelle all'interno del corpo umano [14].

Nello studio di Mishra et al. [18], viene confrontata la crescita delle cellule tumorali polmonari umane in un modello 3D *ex vivo* con quella in una coltura 2D, nelle stesse condizioni di coltura per 15 giorni, con lo scopo di determinare quale dei due sistemi imita meglio la crescita del cancro del polmone nei pazienti.

Il modello polmonare 3D *ex vivo* è costituito da una matrice naturale decellularizzata che forma una barriera tra gli spazi endoteliali e quelli epiteliali e consente alle cellule di crescere nel tempo, il che può dimostrare una condizione dinamica che non si vede nei modelli 3D *in vitro*.

Sono state trovate differenze significative nella formazione di noduli tumorali, numero totale di cellule, tassi di proliferazione e morte cellulare, e produzione di metalloproteinasi della matrice (MMP). Le MMP svolgono un ruolo chiave nell'invasione, migrazione e metastasi delle cellule tumorali degradando la matrice extracellulare (ECM) e le membrane basali.

La principale caratteristica del cancro del polmone è la formazione di un nodulo polmonare che può essere rilevato clinicamente con l'imaging o con la tomografia computerizzata. Questi tumori polmonari crescono nel tempo e metastatizzano ai linfonodi e ad altri organi.

- A differenza della coltura 2D, il modello polmonare 3D *ex vivo* ha mostrato la formazione e la crescita di noduli tumorali perfusibili, con proteine secrete che sono importanti per la crescita e la metastasi del tumore nel tempo.
- La proliferazione e l'apoptosi sono maggiori nel modello polmonare 3D *ex vivo* rispetto alla coltura 2D.
- Dopo 15 giorni, è stato trovato un numero molto più elevato di cellule nella coltura 2D rispetto al modello polmonare 3D *ex vivo*.

- Le cellule del cancro del polmone cresciute nel modello polmonare 3D ex vivo hanno prodotto MMP presenti anche nei campioni umani, a differenza delle cellule cresciute nella coltura 2D.

Nel complesso, le cellule del cancro del polmone umano cresciute nel modello polmonare 3D ex vivo hanno caratteristiche che imitano la crescita e la metastasi del cancro del polmone nei pazienti, contrariamente alle cellule cresciute in coltura 2D. Pertanto, il modello polmonare 3D ex vivo può essere un modello migliore con cui studiare la crescita e le metastasi del cancro del polmone rispetto alla coltura 2D.

Limiti dei modelli di coltura 2D

Come si evince dallo studio di Mishra e dei suoi collaboratori, le colture cellulari bidimensionali (2D) hanno fornito una visione approfondita della capacità delle cellule tumorali di crescere, ma non imitano in maniera sufficiente le interazioni cellula-cellula e cellula-ambiente extracellulare presenti *in vivo*.

Queste interazioni sono fondamentali in quanto responsabili della differenziazione cellulare, della proliferazione, della vitalità, dell'espressione di geni e proteine, della risposta agli stimoli, del metabolismo dei farmaci e di altre funzioni cellulari.

Dopo l'isolamento dal tessuto e il trasferimento delle cellule in colture 2D, la loro morfologia viene alterata, così come la modalità di divisione cellulare. Tutto ciò può influenzare la loro funzione, l'organizzazione delle strutture all'interno della cellula, la secrezione e la segnalazione cellulare [12].

Modelli tridimensionali (3D) di colture cellulari e tissutali

Nel corso degli anni sono stati sviluppati modelli 3D *in vitro* nel tentativo di colmare il divario tra le colture 2D tradizionali e i modelli animali [18]. Nei sistemi di coltura 3D le cellule possono formare aggregati o sferoidi utilizzando uno scaffold o una matrice, oppure in un mezzo di sospensione.

Le colture 3D basate su scaffold o matrice possono essere realizzate seminando cellule su una matrice 3D decellularizzata o disperdendo le cellule in una matrice liquida seguita da solidificazione o polimerizzazione.

Gli sferoidi cellulari 3D privi di un'impalcatura, possono essere generati in sospensione mediante il metodo della goccia sospesa (hanging drop) o con approcci basati sull'agitazione (spinner flask) [14]. Gli sferoidi 3D sono costituiti da cellule che si trovano in stadi diversi, come cellule proliferanti, quiescenti, apoptotiche e necrotiche. Questa eterogeneità cellulare è molto simile ai tessuti *in vivo*, in particolare nei tumori. Ad esempio, gli strati esterni di uno sferoide sono costituiti principalmente da cellule proliferanti, in quanto sono altamente esposti al mezzo. Invece, le cellule centrali, poiché ricevono meno ossigeno, fattori di crescita e nutrienti dal mezzo, tendono ad essere in uno stato di quiescenza o ipossico [14].

Con ciascuno di questi metodi, le cellule crescono in un ambiente 3D, di conseguenza possono interagire tra di loro, con la matrice extracellulare e con il microambiente. Inoltre, queste interazioni e tale disposizione spaziale 3D, influenzano una serie di funzioni cellulari, tra cui la proliferazione cellulare, la differenziazione, la morfologia, l'espressione genica e proteica e le risposte cellulari agli stimoli esterni. Siccome la morfologia e le interazioni delle cellule all'interno delle colture 3D sono più simili al microambiente *in vivo*, anche i processi cellulari di queste cellule sono analoghi a ciò che avviene *in vivo* [14].

Gli sferoidi sono stati utilizzati per studiare il metabolismo cellulare la necrosi, l'angiogenesi e l'adesione. Inoltre, sono ampiamente utilizzati per lo screening dei farmaci e forniscono una piattaforma per vari studi elettrofisiologici e immunoistochimici [19].

Queste strutture hanno caratteristiche simili ai tumori *in vivo*, di conseguenza il loro utilizzo è molto diffuso nella biologia del cancro per studiare l'invasione, le metastasi, i farmaci antineoplastici, la radioreattività e gli effetti ipossici [19].

Ci sono limitazioni, tuttavia, agli attuali modelli 3D *in vitro*. Questi modelli non riescono a ricostituire le caratteristiche strutturali e meccaniche di interi organi viventi, che sono importanti per svolgere le loro funzioni. In particolare, i modelli 3D esistenti mancano della presenza di un sistema vascolare, che ostacola la loro capacità di imitare l'ambiente *in vivo* e mantenere il comportamento dinamico delle cellule. Inoltre, non consentono l'applicazione di forze meccaniche dinamiche, come i movimenti respiratori dei polmoni. [18][20].

In Tabella 1.1 vengono riassunte le principali caratteristiche cellulari dei sistemi di

coltura 2D e 3D.

Organ on a chip

Gli studi in cui si utilizzano modelli animali comportano delle problematiche dal punto di vista etico, risultano essere complicati e l'interpretazione dei risultati presenta alcune difficoltà a causa delle differenze anatomiche esistenti tra gli animali e gli esseri umani. Di conseguenza, i modelli animali hanno un'applicabilità limitata negli studi clinici sull'uomo [21].

Sin dai primi anni del 1900, i sistemi di coltura *in vitro* 2D sono stati ampiamente utilizzati dal momento che forniscono una panoramica sul comportamento delle cellule e dei microrganismi [21][22]. Al tempo stesso, però presentano alcuni limiti. Le colture 2D non riescono a riprodurre l'architettura, le proprietà meccaniche e funzionali dei tessuti nativi. Inoltre, con questi sistemi non è possibile riprodurre le interazioni cellula-cellula e quelle tra cellula e matrice extracellulare, come avviene *in vitro*.

Per questi motivi, è richiesto lo sviluppo di modelli tridimensionali *in vitro*, che si pongano come alternativa alle metodologie classiche. Questi modelli devono essere in grado di comprendere i meccanismi fisiologici e patologici tipici del tessuto polmonare, e di consentire il controllo rigoroso dei segnali biochimici e biofisici più rilevanti presenti all'interno delle cellule polmonari [21]. Il principale vantaggio della tecnologia organ-on-a-chip è la sua capacità di rappresentare la complessità strutturale e funzionale dei tessuti e degli organi viventi, a differenza delle tecniche di coltura cellulare *in vitro*, che falliscono nella riproduzione del microambiente dinamico, meccanico e biochimico [22]. La tecnica organ on a chip, tramite la coltivazione delle cellule che compongono gli organi viventi su chip, permette di imitare e riprodurre le risposte cellulari meccaniche e fisiologiche, oltre che le funzioni e le caratteristiche degli organi stessi [23]. Per questo motivo, queste piattaforme hanno il potenziale di fornire nuove informazioni sulla normale funzione polmonare e su quella patologica. Inoltre, queste tecniche permettono di prevedere in modo maggiormente accurato l'efficacia e la sicurezza di nuovi trattamenti in un microambiente che simula e riproduce quello polmonare [21].

Caratteristiche cellulari	2D	3D
Proliferazione	Spesso proliferano a un ritmo più veloce che <i>in vivo</i> .	Possono proliferare a una velocità più rapida/lenta rispetto alle cellule coltivate in 2D a seconda del tipo di cellula e/o del tipo di sistema modello 3D.
Morfologia	Cellule lastriformi, piatte e allungate, in monostrato (morfologia modificata). Perdita di diversi fenotipi e polarità.	Forma naturale in strutture sferoidi/aggregate (morfologia preservata). Fenotipo diverso e polarità.
Esposizione a nutrienti/farmaci	Le cellule in monostrato sono ugualmente esposte a nutrienti/fattori di crescita/farmaci che sono distribuiti nel mezzo di crescita.	I nutrienti e i fattori di crescita o i farmaci potrebbero non essere in grado di penetrare completamente nello sferoide, raggiungendo le cellule vicino al nucleo.
Sensibilità ai farmaci	Le cellule spesso soccombono al trattamento e i farmaci sembrano essere molto efficaci.	Le cellule sono spesso più resistenti al trattamento rispetto a quelle nel sistema di coltura 2D, essendo spesso migliori predittori delle risposte ai farmaci <i>in vivo</i> .
Interazioni cellulari	Priva di interazioni cellula-cellula e cellula-ambiente extracellulare, nessun microambiente simile a quello <i>in vivo</i> .	Si creano adeguate interazioni cellula-cellula e cellula-ambiente extracellulare.
Meccanismi molecolari	Cambiamenti nell'espressione genica, nello splicing dell'mRNA, nella topologia e nella biochimica delle cellule.	Espressione di geni, splicing, topologia e biochimica delle cellule come <i>in vivo</i> .
Costi mantenimento di una coltura	Test economici e disponibili in commercio.	Test più costosi, più dispendiosi in termini di tempo e meno disponibili in commercio.

Tabella 1.1: Differenze tra i modelli di coltura 2D e 3D [12][14].

I dispositivi microfluidici sono comunemente realizzati in polidimetilsilossano (PDMS) tramite l'impiego di tecniche di litografia soft [24]. Nonostante il PDMS sia stato il materiale preferito per la fabbricazione della maggior parte dei dispositivi lung-on-a-chip e delle loro membrane, presenta un elevato assorbimento di piccole molecole. Questo comporta l'assorbimento di farmaci idrofobici, ostacolando in tal modo l'uso diffuso di questi dispositivi basati su PDMS per lo screening dei farmaci [21].

Il primo dispositivo lung-on-a-chip che ha permesso di ricreare la barriera sanguinea, è stato creato dal gruppo di ricerca di Hugh. Attraverso l'uso della litografia soft, hanno generato un dispositivo PDMS costituito da due microcanali separati da una membrana porosa ed estensibile dello spessore di 10 μm , quest'ultima ricoperta di proteine dell'ECM.

Il lato superiore della membrana è stato seminato con cellule epiteliali alveolari umane, mentre il lato inferiore è stato seminato con cellule endoteliali dei capillari polmonari. Svuotando i terreni di coltura cellulare del canale superiore e mantenendo un flusso continuo di mezzi nel canale inferiore (vascolare), i ricercatori hanno generato un'interfaccia aria-liquido che riproduce la barriera alveolare-capillare. La simulazione della respirazione fisiologica era realizzabile tramite l'allungamento ciclico delle cellule attraverso l'applicazione del vuoto. Ciò permette di deformare la membrana elastica a cui le cellule sono aderite.

In questo modo, il gruppo di ricerca di Hugh ha potuto studiare in modo accurato i processi fisiologici polmonari come il potenziale di differenziazione delle cellule progenitrici epiteliali. Inoltre ha potuto approfondire ed effettuare studi tossicologici e riprodurre alcune condizioni all'interno del tessuto polmonare come l'edema e la trombosi [21].

Un'altra applicazione del lung-on-a-chip è quella effettuata dal gruppo di ricerca di Sellgren. Essi hanno creato un dispositivo microfluidico biomimetico composto da tre compartimenti individualmente accessibili e impilati verticalmente, separati l'uno dall'altro da una membrana nanoporosa sintetica. Descrivendo il dispositivo dall'alto verso il basso, i compartimenti contenevano tracheobronchiali, seguiti

da fibroblasti polmonari o cellule primarie endoteliali, coltivate su un'interfaccia aria-liquido [21].

Humayun et al. hanno progettato un dispositivo costituito da tre compartimenti in cui un idrogel sospeso, composto da una miscela di collagene I e Matrigel, è stato iniettato nel compartimento centrale per fungere da barriera tra le cellule epiteliali delle vie aeree e le cellule muscolari lisce. In tal modo, si è evitato l'uso di membrane porose sintetiche per ricreare la lamina. Alcuni di questi modelli riproducevano anche l'infiammazione asmatica, e sono stati utilizzati come piattaforme per verificare e studiare l'efficacia dei farmaci all'interno di un microambiente che simula dal punto di vista biologico la patologia [21].

Sebbene questi sistemi non ricreano la complessa architettura tridimensionale della barriera alveolare presentano numerosi vantaggi come la facilità di fabbricazione, il basso costo e la capacità di applicare diversi segnali biofisici alle cellule in coltura. Per questo motivo questi dispositivi hanno acquisito un notevole interesse per questi studi. Inoltre, questi modelli hanno mostrato una particolare importanza per lo studio dei meccanismi molecolari alla base della nascita e dello sviluppo di disturbi come il cancro al polmone [21].

1.4 Ingegneria tissutale

L'ingegneria dei tessuti (TE) è un campo interdisciplinare principalmente focalizzato sullo sviluppo di sostituti di tessuti e organi controllando parametri biologici, biofisici e/o biomeccanici in laboratorio. L'ingegneria tissutale si basa principalmente su tre elementi fondamentali: gli scaffold, le cellule e le molecole bioattive. Pertanto è necessario scegliere con attenzione quale combinazione si adatta meglio all'applicazione desiderata.

L'obiettivo finale della TE è lo sviluppo di costrutti cellulari tridimensionali con proprietà il più simile possibile ai tessuti naturali rispetto alle classiche colture monostrato. Questi sistemi consentono uno studio accurato *in vitro* della fisiologia e della fisiopatologia umana [25].

Scaffold per l'ingegneria tissutale

Le applicazioni di ingegneria tissutale comprendono comunemente l'uso di scaffold tridimensionali (3D), il cui scopo principale è quello di ricreare un microambiente *in vivo*, principalmente fornito dalla matrice cellulare (ECM). Lo scaffold è adatto per l'incorporazione di cellule, fattori di crescita (GF) e per rigenerare tessuti e/o organi danneggiati [26]. Poiché la loro architettura può influenzare in modo significativo la risposta delle cellule e la successiva formazione dei tessuti, gli scaffold devono presentare determinate caratteristiche, come una superficie tale da promuovere la migrazione, la crescita e la differenziazione cellulare. Inoltre, devono mantenere un'integrità strutturale sufficiente durante il processo di crescita e rimodellamento *in vitro* e/o *in vivo* e fornire resistenza meccanica e rigidità iniziali sufficienti per sostituire la funzione meccanica del tessuto malato o danneggiato, che mira a riparare o rigenerare. Poiché gli scaffold verranno impiantati nel corpo umano, devono essere non tossici, biodegradabili e possedere un'elevata biocompatibilità in modo da ridurre al minimo la risposta infiammatoria e immunologica dopo l'impianto [27].

Cellule

Una decisione importante da prendere quando si progettano strategie per TE è la selezione della fonte cellulare. Le cellule dovrebbero soddisfare un requisito di base: integrarsi nel tessuto specifico e secernere vari GF e citochine che attivano il programma di rigenerazione del tessuto endogeno. Il primo approccio nelle tecniche cellulari è l'uso di cellule progenitrici native. Il problema principale è la difficoltà di coltivare alcuni tipi di cellule specifici per ottenere grandi quantità. Fonti cellulari alternative sono le cellule staminali che possono essere suddivise in:

- cellule staminali embrionali (ESC),
- cellule staminali adulte (ASC),
- cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC) [25][28].

In Tabella 1.2 sono riportanti i vantaggi e gli svantaggi di ciascuna fonte cellulare utilizzata nell'ingegneria tissutale.

TIPO DI CELLULE	VANTAGGI	SVANTAGGI
Cellule progenitrici native	<ul style="list-style-type: none"> • No reazione immunitaria 	<ul style="list-style-type: none"> • Difficoltà di coltivare alcuni tipi cellulari specifici per ottenere grandi quantità.
Cellule staminali embrionali (ESC): sono cellule pluripotenti	<ul style="list-style-type: none"> • Elevata capacità di differenziarsi in qualsiasi ceppo; • Elevata capacità di proliferare in uno stato indifferenziato. 	<ul style="list-style-type: none"> • Problemi etici; • Sviluppo di teratomi.
Cellule staminali adulte (ASC): sono cellule multipotenti	<ul style="list-style-type: none"> • Elevata capacità di rinnovamento cellulare; • No reazione immunitaria; • Produzione di citochine e chemochine che riducono l'infiammazione e la morte cellulare. 	<ul style="list-style-type: none"> • Mancanza di conoscenze sufficienti sui meccanismi che controllano il loro destino; • Capacità di differenziazione più limitata rispetto alle ESC.
Cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC): sono cellule somatiche riprogrammate in uno stato pluripotente attraverso l'introduzione di un insieme di fattori di trascrizione	<ul style="list-style-type: none"> • Carattere autologo; • Capacità di differenziazione; • Robustezza e semplicità della procedura di riprogrammazione. 	<ul style="list-style-type: none"> • I meccanismi molecolari alla base della riprogrammazione dovrebbero essere caratterizzati con precisione prima dell'utilizzo in applicazioni cliniche.

Tabella 1.2: Fonti cellulari per l'ingegneria tissutale [25][28].

Molecole bioattive

Le molecole bioattive hanno la capacità di dirigere le cellule nei tessuti ingegnerizzati verso uno specifico fenotipo e guidarne la migrazione, la proliferazione e la differenziazione. Inoltre, esse hanno la capacità di influenzare le cellule native verso processi come la vascolarizzazione dell'innesto o la rigenerazione *in situ*. La scelta delle biomolecole da utilizzare dipende dal tessuto bersaglio che si intende trattare [28].

Nella Figura 1.3 è riassunta la strategia ideale dell'ingegneria tissutale, che prevede i seguenti passaggi [29]:

1. Il primo step prevede il prelievo di cellule specifiche del paziente.
2. Le cellule vengono poste in coltura. In questo modo, proliferano e producono matrice extracellulare.
3. Le cellule sono combinate con molecole bioattive e fattori di crescita in uno scaffold 3D e sono coltivate *in vitro* in un ambiente favorevole alla formazione di costrutti cellulari tridimensionali con proprietà più simili ai tessuti naturali.
4. I costrutti così ingegnerizzati possono essere impiantati.

1.5 3D Bioprinting

Negli ultimi anni, la tecnica di produzione additiva (AM) è stata ampiamente utilizzata nella fabbricazione di strutture complesse per la rigenerazione dei tessuti con proprietà strutturali, meccaniche e biologiche appropriate in relazione alle esigenze specifiche del paziente. Tra le varie tecniche AM, la più conosciuta ed utilizzata per la biofabbricazione di sistemi complessi di tessuti e organi è la 3D bioprinting, una tecnica di deposizione del materiale strato su strato. Questa tecnica consente di depositare simultaneamente o in sequenza più materiali e diversi tipi di cellule durante lo stesso processo di stampa.

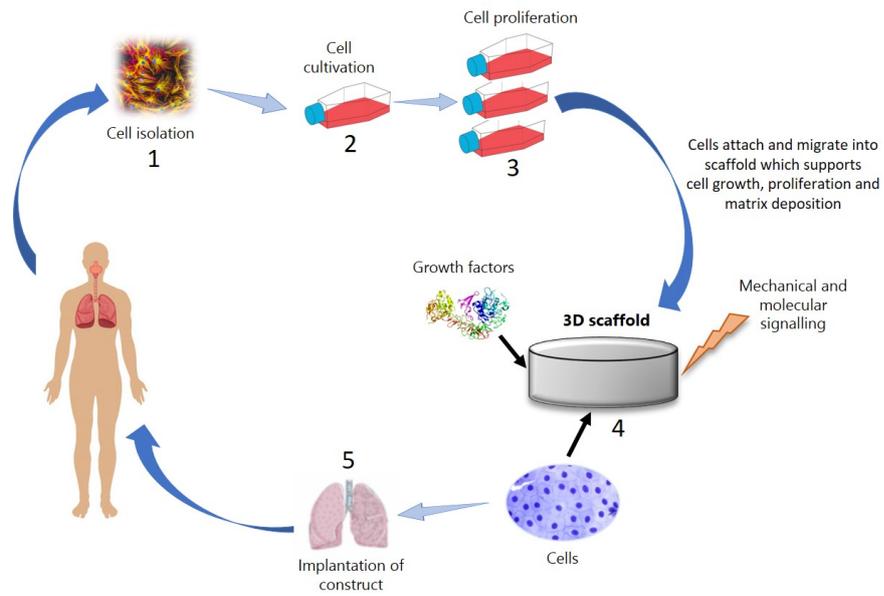


Figura 1.3: Strategia dell'ingegneria tissutale.

Durante il processo di fabbricazione, bisogna prendere in considerazione alcuni fattori importanti, come:

- Fedeltà di stampa
- Stabilità
- Tempo
- Resistenza meccanica e l'elasticità
- Incapsulamento cellulare
- Condizioni di compatibilità cellulare
- Proprietà di assottigliamento al taglio [30][31][32]

1.5.1 Bioink

Per la bioprinting, il materiale depositato viene definito bioinchiostro (*bioink*), costituito da biomateriali, molecole biochimiche, cellule o qualsiasi loro miscela.

La stampabilità, la fedeltà della forma, la risoluzione strutturale e la funzionalità dei tessuti e degli organi stampati finali dipendono dalle proprietà reologiche, meccaniche e biologiche del bioink.

La viscosità del bioink è fondamentale per produrre costrutti carichi di cellule, inoltre, il frequente intasamento dell'ugello si verifica con inchiostri altamente viscosi mentre la deformazione e il collasso delle strutture si verificano con materiali a bassa viscosità. Un altro parametro importante è la concentrazione di bioink, infatti un aumento della sua concentrazione influisce direttamente sulla vitalità cellulare, poichè la migrazione e la proliferazione cellulare sono inibite a causa dell'intreccio delle catene polimeriche.

Per preservare i bioink e le cellule durante la stampa è di fondamentale importanza la velocità di stampa, in quanto i processi di stampa prolungati comportano una ridotta vitalità cellulare. Per quanto riguarda la composizione dei bioink, si utilizzano polimeri naturali, sintetici o una combinazione di entrambi [30][33].

Polimeri naturali

I vantaggi nell'utilizzo di idrogel naturali per bioink sono legati alla loro biodegradabilità e alla mancanza di tossicità. Inoltre, molti polimeri a base naturale hanno pesi molecolari elevati, portando alla formazione di gel con viscosità relativamente elevate a concentrazioni proteiche inferiori, in modo da ridurre l'ingombro per le cellule rispetto ai materiali sintetici biodegradabili. Nel caso in cui si abbiano basse concentrazioni di polimeri, le proprietà meccaniche del materiale sono relativamente deboli e vi sono difficoltà con il mantenimento della forma, inoltre è necessario prendere in considerazione il rischio di agenti patogeni trasmissivi (patogeni, virus) [31].

1.5.2 Tecniche di stampa 3D

Tra le varie tecniche di stampa 3D, quelle più comunemente utilizzate nell'ingegneria dei tessuti sono:

- Stampa a getto di inchiostro (o drop-on demand)

- Stampa laser assistita
- Stampa per estrusione

Nonostante i significativi sviluppi in termini di velocità, precisione e risoluzione della stampa, ciascuna delle tre tecniche ha i suoi limiti.

In Tabella 1.3 sono riportate le principali caratteristiche di ciascuna tecnica di stampa 3D.

Stampa per estrusione

Per quanto riguarda la stampa per estrusione, che verrà utilizzata in questo studio, l'inchiostro viene erogato da una forza pneumatica (alta pressione) o meccanica (pistone o vite), solitamente in modo continuo su substrati sterili. I filamenti stampati vengono reticolati da luce (principalmente UV), enzimi, sostanze chimiche o calore per formare strutture meccanicamente durevoli. Questo metodo di stampa è adatto per la deposizione di inchiostri a viscosità più elevata e densità cellulari più elevate. Il rischio di intasamento è inferiore rispetto alla stampa a getto d'inchiostro. Tuttavia, la vitalità cellulare è compromessa sotto la deformazione indotta dallo stress di taglio durante la deposizione di inchiostro. Un parametro importante è la velocità di taglio poiché determina lo sforzo di taglio applicato alle cellule stampate, influenzandone appunto la vitalità. Inoltre, nelle stampanti basate su ugelli come le stampanti a getto d'inchiostro e ad estrusione, la dimensione dell'ugello è importante. Sebbene dimensioni più piccole di ugelli e aghi producano risoluzioni più elevate, nelle stampanti per estrusione, le celle incapsulate possono subire elevate sollecitazioni meccaniche, il che porta a una ridotta vitalità cellulare. Pertanto, i parametri di stampa devono essere accuratamente ottimizzati per garantire strutture stampate stabili, senza influire sulla vitalità cellulare. Le stampe ad estrusione recenti sono dotate di più testine di stampa, le quali consentono la deposizione simultanea di diversi bioink con una contaminazione incrociata minima. Inoltre, consentono un migliore controllo su porosità, forma e distribuzione cellulare nel costruito stampato e sono più adatte per fabbricare scaffold o impianti protesici per l'ingegneria tissutale[30][31][33].

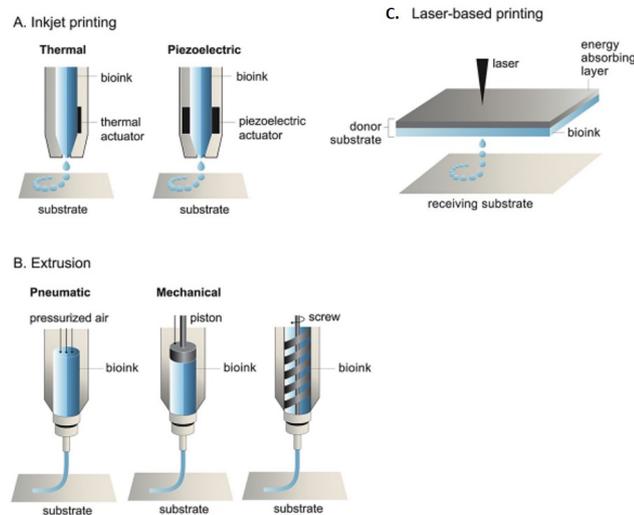


Figura 1.4: Schema delle strategie di 3D bioprinting più comunemente utilizzate nell'ingegneria dei tessuti [31].

1.5.3 Fabbricazione assistita da PC

La fabbricazione di tessuti biomimetici può essere ottenuta mediante l'uso di tecniche di progettazione assistita da computer (CAD) e di fabbricazione assistita da computer (CAM). L'uso del software CAD mira a progettare la struttura del tessuto target, mentre il software CAM è utilizzato per controllare la stampante durante la stampa 3D.

A causa della complessità dell'organizzazione anatomica e strutturale dei tessuti, le informazioni sulla composizione dei tessuti a livello di microscala sono essenziali. La tomografia computerizzata (TC) e la risonanza magnetica (MRI) possono fornire informazioni sulle geometrie e sulla struttura dei tessuti calcificati e molli. Una volta ottenute queste informazioni, le sezioni istologiche 3D vengono progettate in base all'anatomia sottostante del tessuto bersaglio. Lo spessore di queste sezioni dipende dalla risoluzione della stampante e può variare da 100 a 500 μm a seconda della macchina e del materiale utilizzato.

Alcuni parametri importanti come la deformazione, la rigidità, la fusione, l'ostruzione degli ugelli e la viscosità del bioink sono controllate tramite CAM. Inoltre,

il software CAM permette di controllare la sopravvivenza e le proprietà dei componenti cellulari dei bioink. In sostanza, mentre il software CAD è fondamentale per la riproduzione dei tessuti biomimetici, quello CAM salvaguarda la qualità del processo di stampa 3D.[28]

1.6 Idrogeli

1.6.1 Definizione e proprietà

Gli idrogel sono reti polimeriche tridimensionali, in grado di assorbire grandi quantità di acqua grazie ai gruppi idrofilici presenti nello scheletro polimerico e di immagazzinarla grazie alla struttura reticolata che ne ostacola la dissoluzione.

Gli idrogeli possono derivare sia da polimeri naturali che da polimeri sintetici. Quelli a base di polimeri sintetici offrono una maggiore durata, un maggiore assorbimento d'acqua, una migliore resistenza del gel e proprietà regolabili. Tuttavia, gli idrogel di derivazione naturale sono vantaggiosi per quanto riguarda la biocompatibilità e la biodegradabilità, inoltre imitano molte caratteristiche della matrice extracellulare. Gli idrogel possiedono alcune caratteristiche che li rendono adatti per diverse applicazioni biomediche, come:

- elevata sensibilità agli ambienti fisiologici,
- natura idrofila,
- contenuto di acqua simile ai tessuti molli,
- adeguata flessibilità e porosità,
- buona biodegradabilità
- possono imitare la risposta del corpo umano alla variazione delle condizioni ambientali come pH e temperatura.

Gli idrogel naturali come alginato, collagene, chitosano, fibrina, ecc. possono essere utilizzati in ingegneria tissutale nella realizzazione di scaffold, poichè consentono la nutrizione e il trasporto di ossigeno. Inoltre, i pori presenti negli idrogel sono

abbastanza grandi da contenere cellule viventi. Allo stesso tempo, gli idrogel sono caratterizzati da una scarsa resistenza meccanica, anche se l'introduzione della tecnica di stampa 3D consente loro di formare più facilmente le strutture desiderate e più adatte per applicazioni di ingegneria tissutale [34].

Nella Tabella "*Proprietà ideali degli idrogeli per bioprinting*", sono riportate le principali caratteristiche che dovrebbero possedere gli idrogeli per poter essere utilizzati in applicazioni di bioprinting.

Proprietà ideali degli idrogeli per bioprinting	
Stampabilità	<ul style="list-style-type: none"> • Viscosità adeguata; • Proprietà di <i>shear-thinning</i>; • Velocità di stampa ottimale
Biocompatibilità	<ul style="list-style-type: none"> • Adeguata degradabilità; • Supportare adesione cellulare; • No risposta immunitaria; • No tossicità
Proprietà meccaniche	<ul style="list-style-type: none"> • Rigidità; • Elasticità; • Resistenza
Forma e struttura	<ul style="list-style-type: none"> • Fedeltà di forma

Tabella 1.4: Proprietà ideali degli idrogeli per bioprinting [35].

1.6.2 Meccanismo di cross-linking degli idrogeli

Gli idrogel non si disintegrano durante lo *swelling* grazie alla loro struttura reticolata, la quale si può ottenere tramite processi chimici o fisici.

Il meccanismo di cross-linking fisico può essere ottenuto tramite associazione idrofobica, aggregazione di catene, cristallizzazione o legame idrogeno.

Il cross-linking chimico è solitamente ottenuto con l'utilizzo di precursori di gel, come monomeri e un iniziatore, o esposizione alla luce UV.

Idrogel ottenuti tramite cross-linking chimico:

- Hanno giunzioni stabili, come i legami covalenti presenti tra le catene polimeriche, che ne impediscono la loro dissoluzione in solventi e conferiscono loro stabilità (a meno che i legami covalenti non vengano scissi).
- Maggior resistenza meccanica e stabilità.
- Tempo di degradazione più lungo rispetto agli idrogel reticolati fisicamente.

Idrogel ottenuti tramite cross-linking fisico:

- Esiste solo un'interazione fisica tra le catene polimeriche.
- Assenza di agenti reticolanti tossici.
- Difficoltà nel controllare le proprietà del materiale, come il tempo di gelificazione, la dimensione dei pori della rete, il tempo di degradazione e la funzionalizzazione chimica.
- Limitate proprietà meccaniche [34].

1.7 Collagene

1.7.1 Definizione e struttura

In diverse applicazioni di ingegneria tissutale è stata proposta un'ampia varietà di scaffold a base di collagene, grazie ad alcune caratteristiche che possiede, come:

- Biocompatibilità

- Elevata porosità
- Facilità di combinazione con altri materiali
- Facilità di lavorazione
- Idrofilia
- Bassa antigenicità
- Assorbibilità nel corpo

Questi scaffold sono progettati per promuovere una risposta biologica, come l'interazione cellulare, e per mimare le funzioni della matrice extracellulare, guidando la rigenerazione dei tessuti. Tuttavia, il collagene presenta alcuni svantaggi, tra cui gli alti costi di produzione, dovute alle lunghe e complesse procedure necessarie per l'isolamento e la purificazione; un'attenta selezione delle condizioni di lavoro per evitare la sua denaturazione e l'elevato rigonfiamento *in vivo*.

Il collagene è una delle proteine strutturali più abbondanti nei mammiferi. Ad oggi sono stati identificati circa 28 tipi di collagene, anche se il più diffuso nella matrice extracellulare è il collagene di tipo I.

La caratteristica distintiva della proteina del collagene è la sua complessa conformazione gerarchica, suddivisa in quattro strutture [29]:

1. **Struttura primaria:** è data dalla ripetizione della tripletta $Gly-Xaa-Yaa$, dove Gly rappresenta la glicina, mentre Xaa e Yaa possono essere qualsiasi amminoacido, anche se tendenzialmente sono la prolina e l'idrossiprolina. La ripetizione regolare della struttura primaria consente la formazione di un filamento costituito da circa 1000 amminoacidi [29].
2. **Struttura secondaria:** ogni filamento assume una conformazione elicoidale sinistrorsa, poiché tutte le catene presentano come terzo residuo la glicina. Queste catene polipeptidiche sono dette catene pro- α e presentano alle estremità un propeptide aminotermine (N-terminale), coinvolto nella regolazione dei diametri delle fibrille primarie, ed uno carbossiterminale (C-terminale), coinvolto nell'inizio della formazione della tripla elica.

Tre catene α si uniscono per formare una struttura a tripla elica, che costituisce il procollagene, la cui sintesi avviene all'interno della cellula. Successivamente, il procollagene è secreto nella matrice extracellulare attraverso una vescicola del Golgi [29].

3. **Struttura terziaria:** le tre catene α si avvolgono l'una all'altra per formare una tripla elica destrorsa dove i residui di glicina, più piccoli, si trovano attorno a un asse centrale, mentre gli amminoacidi più grandi come prolina e idrossiprolina occupano posizioni più esterne. In questo modo si ottiene il tropocollagene, l'unità base del collagene.

Le catene sono legate tra di loro tramite legami idrogeno che si formano, in particolare, tra i gruppi $N-H$ della glicina e i gruppi $O-H$ dell'idrossiprolina di un'altra catena [29].

4. **Struttura quaternaria:** le molecole di tropocollagene tendono ad auto-assemblarsi in fibrille disposte in fasci paralleli, secondo una struttura molto precisa in cui le molecole di tropocollagene sono sfalsate di 67 nm . Infine, le fibrille di collagene si aggregano in fasci più grandi, formando le fibre di collagene [36][29].

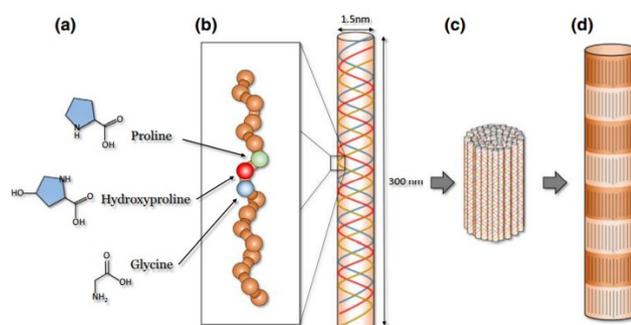


Figura 1.5: Struttura gerarchica del collagene [37].

1.7.2 Self-assembly del collagene

L'assemblaggio delle molecole di collagene in fibrille è un processo guidato dall'entropia, simile a quello che si verifica in altri sistemi di autoassemblaggio delle

proteine, come i microtubuli, i filamenti di actina e i flagelli [38].

Parametri come la concentrazione di collagene, la forza ionica, il pH e la temperatura della soluzione, influenzano sia il processo di autoassemblaggio del collagene che la morfologia, l'organizzazione delle reti di fibrille di collagene, la densità delle microfibrille, la periodicità D e le interazioni collagene-substrato.

Come si osserva dalla Figura 1.6, l'autoassemblaggio delle molecole di collagene di tipo I in soluzione avviene in più fasi:

1. Formazione di dimeri/trimeri e successivamente di filamenti sottili di 4 nm di spessore e lunghi centinaia di nanometri.
2. Allineamento dei filamenti in strutture prefibrillari, orientate uniassialmente e impacchettate in modo lasco.
3. Aumento della densità di impacchettamento dei filamenti, che genera fibrille compatte. Tuttavia, le fibrille non mostrano ancora la periodicità del banding D.
4. All'allineamento dei filamenti all'interno delle fibrille per formare le bande D di 67 nm, caratteristiche del collagene di tipo I.

La formazione dei filamenti spessi 4 nm nella prima fase avviene durante la fase di latenza, mentre le fasi successive si verificano nella fase esponenziale [39].

Le fibrille di collagene sono responsabili della stabilità meccanica e delle funzioni biologiche, inoltre forniscono siti di attacco per molte macromolecole tra cui la fibronectina, i proteoglicani e i recettori di superficie cellulare come le integrine [40][41].

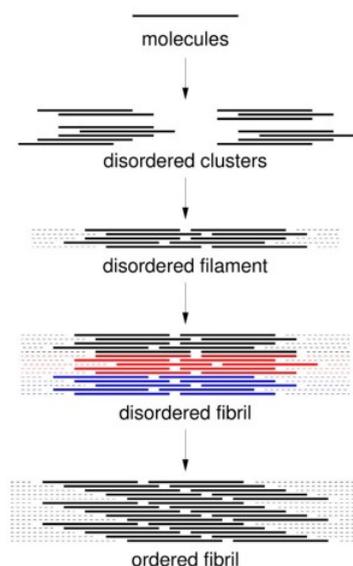


Figura 1.6: Schema del processo di self-assembly del collagene [39].

1.7.3 Proprietà: fibrillogenesi

Come spiegato nel paragrafo precedente, sia *in vivo* che *in vitro*, i monomeri di collagene di tipo I si auto assemblano in strutture fibrillari. Questo processo è noto come *fibrillogenesi* [42].

In molti studi, è stato osservato che la morfologia delle fibrille che si formano durante la fibrillogenesi del collagene *in vitro* è molto simile a quella delle fibrille formate *in vivo*. Tuttavia, ci sono importanti differenze nel modo in cui le molecole si assemblano nei due sistemi.

1. La fibrillogenesi *in vivo* è sotto il diretto controllo cellulare ed è più complessa del semplice processo di autoassemblaggio osservato *in vitro*.
2. In alcuni studi è stato dimostrato che molti dei componenti macromolecolari solitamente presenti nella matrice extracellulare, vari enzimi compresi quelli che reticolano il collagene, glicoproteine e proteoglicani, possono influenzare significativamente la fibrillogenesi del collagene di tipo I. *In vitro*, gli esperimenti di fibrillogenesi sono normalmente condotti con soluzioni purificate di molecole di collagene, estratte da tessuti. Per questo motivo, queste macromolecole

sono assenti o presenti solo in quantità relativamente piccole, mentre *in vivo* possono svolgere ruoli importanti durante l'assemblaggio delle fibrille.

3. Le soluzioni di collagene sono normalmente sistemi polidispersi, contenenti concentrazioni diluite di monomeri, dimeri e aggregati oligomericici di molecole di collagene. Questi aggregati possono essere reticolati covalentemente o, a seconda delle condizioni della soluzione, tenuti insieme da interazioni idrofobe o ioniche. Al contrario, è stato dimostrato che *in vivo*, i fibroblasti possono secernere molecole di collagene di tipo I, non individualmente, ma in pacchetti ad alta concentrazione di aggregati di procollagene, la forma precursore del collagene. Pertanto, lo stato di aggregazione, la concentrazione effettiva e il microambiente differiscono *in vitro* ed *in vivo*.
4. Alcuni studi sulla soluzione hanno indicato che l'assemblaggio delle fibrille *in vitro* è un processo a più fasi piuttosto che un semplice processo di nucleazione e crescita. Pertanto, alcune fasi dell'assemblaggio delle fibrille possono essere caratterizzate da specifici aggregati intermedi [43].
5. *In vitro*, le proprietà strutturali e meccaniche della rete possono anche essere regolate introducendo reticolanti e componenti secondari di gel, nonché variando la temperatura, il pH e la forza ionica durante l'autoassemblaggio [42].
6. Il numero, la lunghezza, il diametro e la disposizione tridimensionale delle fibrille di collagene *in vivo* sono regolate dai requisiti meccanici dei singoli tessuti [44].

Fibrillogenesi del collagene *in vitro*

Come si osserva dalla Figura 1.7, i collagene fibrillari sono sintetizzati come molecole di procollagene, precursori solubili, i quali contengono propeptidi (N- e C-propeptide) a ciascuna estremità della tripla elica. Questi vengono rimossi dalle N- e C-proteinasi del procollagene per produrre collagene. I collagene finali hanno triple eliche ininterrotte lunghe circa 300nm fiancheggiate da corti telopeptidi, non

a tripla elica, che contengono siti di legame critici per l'assemblaggio delle fibrille di collagene. I telopeptidi sono fondamentali nel dirigere l'assemblaggio delle fibrille D-periodiche *in vitro*. Infatti, la perdita parziale di entrambi i telopeptidi porta a un processo di assemblaggio meno efficiente [44].

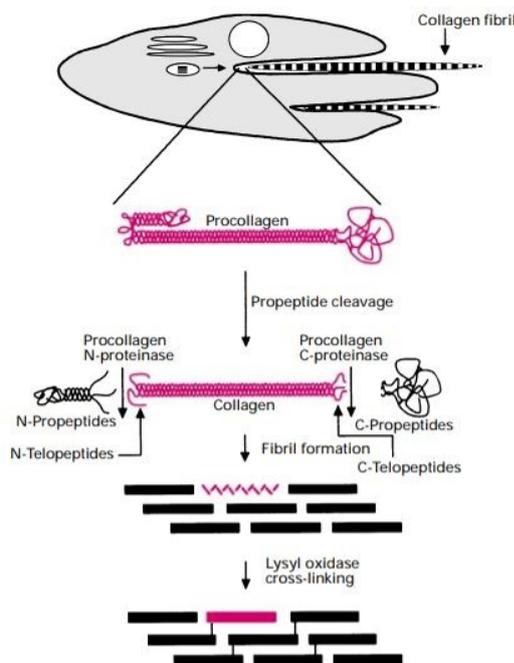


Figura 1.7: Eventi extracellulari nella sintesi delle fibrille di collagene [38].

L'assemblaggio delle fibrille di collagene *in vitro* può essere indotto in due diversi modi, come si osserva dalla Figura 1.8:

1. Partendo da una soluzione di collagene acida (pH=3-4) e fredda (4°C), che viene riscaldata e successivamente neutralizzata (avvio a caldo). Portando la miscela a pH fisiologico si ottiene un gel reticolato rigido.
2. Partendo da una soluzione di collagene in acido acetico. La soluzione viene prima neutralizzata e poi riscaldata (inizio neutro). Si ha un'iniziale aggregazione delle molecole di collagene ed una successiva fase di crescita di fibrille.

Un ulteriore metodo è quello di procedere in modo simultaneo con la neutralizzazione e il riscaldamento [43][29].

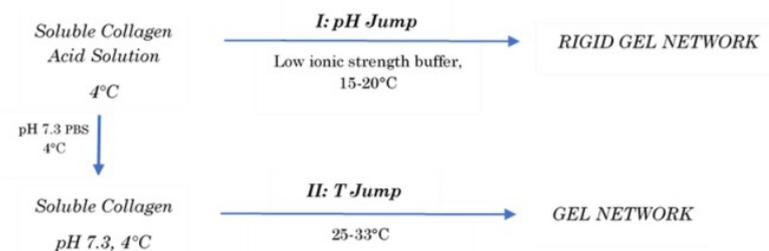


Figura 1.8: Vie per ottenere la fibrillogenesi del collagene *in vitro* [43].

1.7.4 Thioflavina (ThT)

La thioflavina T (ThT) è un colorante fluorescente della famiglia dei benzotiazolo, ampiamente utilizzato per monitorare e caratterizzare l'amiloidogenesi *in vitro*. Inoltre è stato utilizzato per monitorare la formazione di fibrille di collagene. Morimoto et al. hanno riferito che ThT può legarsi specificamente alle fibrille di collagene, mostrando così una maggiore emissione di fluorescenza a 485 nm con eccitazione a 430 nm. Non si osserva alcun miglioramento della fluorescenza nella miscela con molecole di collagene libero o collagene denaturato. Inoltre, l'analisi delle proprietà spettrali del ThT in solventi con diverse proprietà dielettriche e in forma incorporata di fibrille ha rivelato che lo spettro di assorbimento, ma non lo spettro di fluorescenza, dipende in modo significativo dalla polarità del solvente. Lo spettro di assorbimento ThT ha le lunghezze d'onda più corte (412 nm) e più lunghe (450 nm) nell'acqua e nell'acqua incorporata rispettivamente nelle fibrille amiloidi. Lo spettro di assorbimento risultante dalla sottrazione dello spettro di ThT misurato in soluzione acquosa e dello spettro colorante misurato in presenza di fibrille amiloidi, ha rivelato che le molecole di ThT legate alle fibrille sono caratterizzate dal massimo assorbimento a 450 nm [45][46][47].

Primo caso di studio: "Detection of type I collagen fibrils formation and dissociation by a fluorescence method based on thioflavin T" di Meilian Zou, Huan Yang,

Haibo Wang, Haiyin Wang, Juntao Zhang, Benmei Wei, Hanjun Zhang e Dong Xie [45].

In questo studio, sono state monitorate la fibrillogenesi e la dissociazione termica del collagene solubile in pepsina (PSC), estratto dalla pelle della testa di serpente, con un metodo di fluorescenza basato sulla thioflavina (ThT).

Protocollo

Soluzione di collagene: la soluzione PSC (1,5 mg/mL in acido acetico 0,5 M) è stata preparata e dializzata contro tampone fosfato (PBS, 200 mM, pH 7,4) a 4 °C per 2 giorni. Successivamente, la soluzione di PSC (0,5 mg/mL) e PSC / ThT (concentrazioni finali 0,5 mg/mL e 50 µM, rispettivamente) in PBS è stata preparata e incubata a 30 °C per 60 minuti al buio totale per indurre fibrillogenesi e ottenere assemblato-PSC e assemblato PSC/ThT. La cinetica della fibrillogenesi è stata monitorata registrando l'assorbanza a 310 nm in funzione del tempo su uno spettrofotometro UV.

Il PSC/ThT assemblato è stato dissociato a 45 °C per 60 min per ottenere PSC/-ThT dissociato.

Spettroscopia di fluorescenza di ThT, PSC e di una miscela di PSC e ThT (denominata PSC/ThT) per l'analisi del processo di fibrillogenesi: è stata misurata la fluorescenza (eccitazione a 421 nm) di PSC, PSC/Th-T, con il metodo di Morimoto. Inoltre, è stata misurata la fluorescenza di una soluzione ThT (concentrazione finale 50 µM PBS), incubata per vari periodi a 50 °C, per esaminarne la stabilità termica. Tutte le misurazioni di fluorescenza sono state eseguite alla velocità di 600 nm/min.

Risultati

La Figura 1.9 mostra gli spettri di emissione di fluorescenza di: ThT, PSC puro prima e dopo l'assemblaggio; la miscela di PSC e ThT prima e dopo l'assemblaggio e la miscela di PSC dissociato e ThT.

- La soluzione PSC assemblato e ThT (**assemblato-PSC/ThT**) ha mostrato una maggiore emissione di fluorescenza a 485 nm con eccitazione a 421 nm secondo il metodo di Morimoto et al.
- L'intensità di fluorescenza di **ThT** era simile a quella di **PSC/ThT** e di **PSC/ ThT dissociato**. Questo significa che l'aumento della fluorescenza è specifico per le strutture fibrillari piuttosto che per la struttura a tripla elica.
- Non è stata osservata alcuna fluorescenza di **PSC** e **PSC assemblato** con eccitazione a 421 nm.
- Non è stato osservato nessun cambiamento nell'intensità di fluorescenza di **ThT-dissociato**, ovvero dopo il trattamento termico a 50 °C. Questo dimostra che ThT è un colorante fluorescente adatto per l'analisi della dissociazione termica delle fibrille di collagene.

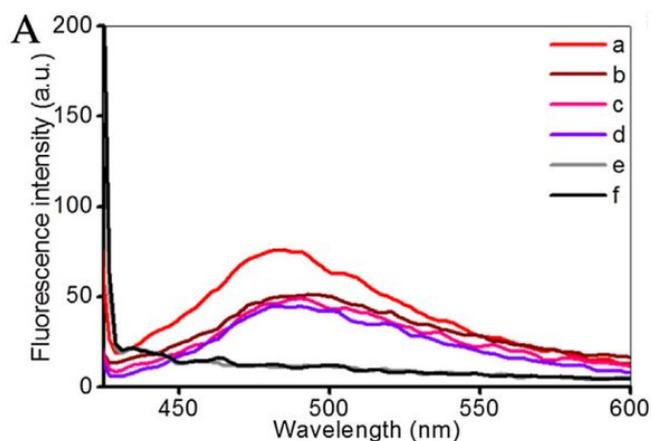


Figura 1.9: Spettri di emissione di fluorescenza di ThT, PSC e PSC/ThT. La curva “a” rappresenta la fluorescenza di PSC/Th-T assemblati; curva “b” quella di PSC/ThT dissociati; curva “c” quella di PSC/ThT; curva “d” quella di ThT; curva “e” quella di PSC; curva “f” quella del PSC assemblato [45].

Influenza di ThT sulla fibrillogenesi di PSC

Come mostrato in Figura 1.10[A], ogni curva di torbidità ha una fase di nucleazione,

una fase di crescita e una fase di plateau. Sia la soluzione PSC che quella PSC/ThT hanno lo stesso stadio di nucleazione (t_n , 250 s) e stadio di plateau (t_p , 1290s). Tuttavia, il valore di equilibrio di torbidità della soluzione PSC/ThT è superiore a quello della soluzione PSC. Questa differenza può essere dovuta all'assorbanza intrinseca di ThT.

Questi risultati dimostrano che l'aggiunta di ThT alla soluzione di collagene non influenza le dinamiche della fibrillogenesi.

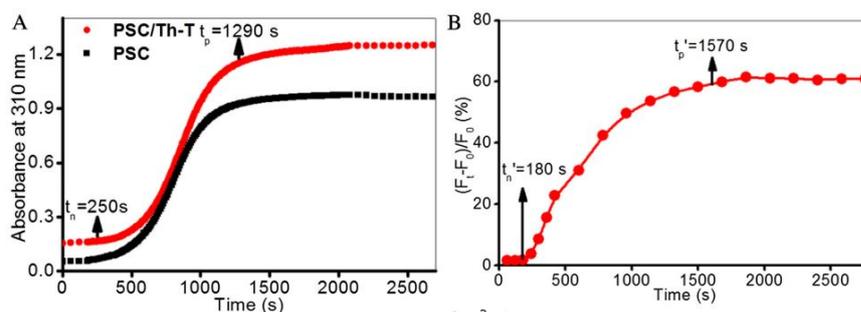


Figura 1.10: (A) Curve torbidità-tempo (assorbanza a 310 nm) di PSC e PSC/ThT. (B) Curva di evoluzione dell'intensità di fluorescenza di PSC/ThT nel processo di autoassemblaggio [45].

Come mostrato in Figura 1.10[B], la curva dell'evoluzione dell'intensità di fluorescenza di PSC/ThT, con emissione a 485 nm ed eccitazione a 421 nm, è coerente con il modello a due fasi di nucleazione e crescita osservato nel saggio di torbidità. Tuttavia, le curve di evoluzione dell'intensità di fluorescenza di PSC/ThT hanno mostrato una fase di nucleazione più breve (t'_n , 180 s) e una fase di plateau più lunga (t'_p , 1570s), rispetto a quelle della curva del tempo di torbidità.

1.7.5 Riboflavina

Il collagene forma idrogel fisici con scarse proprietà meccaniche. In diversi studi, per migliorarne la stabilità meccanica e ridurre la velocità di degradazione viene utilizzata la riboflavina (RF) come fotosensibilizzante per la foto-reticolazione dell'impalcatura di idrogel di collagene. La RF è una vitamina B2 biocompatibile

che ha mostrato una citotossicità minima rispetto ai fotoiniziatori utilizzati convenzionalmente come la glutaraldeide o l'etilidimetilamminopropil-carbodiimmide. La reticolazione risulta dalla formazione del legame covalente tra l'amminoacido della fibrilla di collagene indotta dall'ossigeno singoletto generato dalla RF eccitata dalla luce. Tuttavia, quando irradiata, la produzione di radicali liberi può danneggiare le cellule incapsulate o seminate prima della reticolazione [48][49].

Primo caso di studio: “*Effects of photochemical riboflavin-mediated crosslinks on the physical properties of collagen constructs and fibrils*” di Harvey Rich, Marianne Odlyha, Umber Cheema, Vivek Mudera e Laurent Bozec [50].

In questo studio si combina il metodo di compressione plastica con la reticolazione fotochimica utilizzando la riboflavina come fotoiniziatore, per modulare le proprietà meccaniche dei costrutti di collagene.

Protocollo

Soluzione di collagene: 3 ml di soluzione di collagene di tipo I di coda di topo (2,08 mg/ml di proteina in acido acetico allo 0,6 %) miscelato in modo omogeneo con 0,5 ml di 10X MEM e 0,5 ml di riboflavina 0,25 mM. Per i costrutti di controllo, sono stati aggiunti 0,5 ml di MEM 1X invece di riboflavina per ottenere un costrutto da 5 ml. La soluzione è stata neutralizzata utilizzando NaOH 5 M fino a quando non si è vista la prima sfumatura di rosa cirro. Successivamente è stato aggiunto NaOH 1 M fino a quando l'indicatore del fenolo è cambiato da giallo/arancio a rosa cirro, indicando una soluzione neutralizzata. La soluzione è stata trasferita in uno stampo standard (22 x 33 x 10 mm) e posta in un incubatore a secco a 37 °C per 30 minuti per consentire la fibrillogenesi.

Compressione plastica: I costrutti sono stati rimossi dallo stampo e posti su una sottile rete di nylon, sotto la quale c'era un tampone assorbente di carta Whatman. Una seconda rete di nylon è stata posta sopra i costrutti prima di caricare il vetrino e il peso di 120 g. Il tempo di compressione è durato 5 minuti con

conseguente espulsione di $> 95\%$ di acqua per ottenere un campione di collagene sottili ($50\text{--}60\ \mu\text{m}$). Una volta compressi, i campioni sono stati risciacquati tre volte in PBS.

Reticolazione fotochimica: il costrutto di collagene contenente la riboflavina è stato mantenuto nel suo stampo e posto sotto una lampada (impostata su luce blu (lunghezza d'onda $465\ \text{nm}$), intensità di $4.680\ \text{mW}$, $252\ \text{lumen}$, potenza di ingresso di $36\ \text{W}$). La reticolazione fotochimica è stata eseguita prima o dopo la fase di compressione plastica e i tempi di esposizione sono stati variati per produrre il costrutto del campione a 2,5; 5; 10 e 30 minuti. Una volta preparati, i costrutti sono stati conservati in soluzione tamponata con fosfato (PBS) in un contenitore otticamente opaco a $4\ ^\circ\text{C}$ per un massimo di 7 giorni.

Analisi meccanica dinamica (DMA): è stata eseguita sui costrutti di collagene per fornire una misura per il modulo di Young. Le prove meccaniche sono state eseguite sotto tensione uniassiale utilizzando un carico statico a una velocità di carico di $200\ \text{mN}/\text{min}$ fino al cedimento, con idratazione costante del campione mediante applicazione di tampone.

Risultati

Risposta meccanica in funzione della reticolazione Come si evince dalla Tabella 1.5:

- Il modulo di Young del costrutto di controllo (nessuna riboflavina e nessuna esposizione) è basso se confrontato con il modulo di Young del tessuto nativo, come ad esempio i tendini, che avrebbe moduli nell'intervallo $50\text{--}150\ \text{MPa}$.
- Il costrutto reticolato con riboflavina utilizzando la lampada di attivazione ha un modulo di Young circa 2,5 volte superiore rispetto al costrutto di controllo. Da questi risultati, è chiaro che l'aggiunta e l'attivazione della riboflavina nella soluzione di collagene determinano la generazione di legami incrociati che rinforzano i costrutti di collagene e gli consentono di avere un valore significativamente più alto del modulo di Young.

- Anche il valore del modulo ottenuto esponendo i costrutti di collagene contenenti riboflavina alla luce bianca ambientale è staticamente superiore a quello di un costrutto di collagene di controllo.

CAMPIONI	VALORE MODULO ELASTICO
<i>Etessuto-nativo</i>	50-150 MPa
<i>Econtrollo</i>	249±42 KPa
<i>Ereticolato</i> (465nm, esposizione per 15 minuti)	650±73 KPa
<i>Ewhitelight</i>	496±250 KPa
<i>Ecrosslinked-beforePC</i>	650±73 KPa
<i>Ecrosslinked-afterPC</i>	412±85 KPa

Tabella 1.5: Valori di controllo del modulo di Young, costrutti di collagene reticolati con RF (15 min esposti alla lampada di attivazione) e reticolati con RF (esposto a luce bianca). Valori del modulo di Young dello scaffold in collagene reticolato prima o dopo la fase di compressione plastica [50].

È stato anche studiato l'effetto della compressione plastica combinata con la reticolazione fotochimica. Sono stati ideati due protocolli di reticolazione:

- Fotoattivazione prima della fase di compressione plastica
- Fotoattivazione dopo la fase di compressione plastica.

Come si osserva dalla Tabella 1.5, nel caso del costrutto di collagene reticolato prima della compressione plastica, il valore del modulo di Young continua ad aumentare costantemente fino ad un valore di *Ecrosslinked-beforePC* = (650 ± 73 KPa).

Invece, quando il tempo di esposizione supera i 15 minuti, non viene registrato nessun aumento significativo del modulo di Young. Questo effetto potrebbe essere dovuto all'esaurimento dei singoli ossigeni reattivi presenti in soluzione dopo 15

minuti di esposizione.

Il valore del modulo nel caso del costruito reticolato dopo la compressione plastica è $E_{crosslinked-afterPC} = (412 \pm 85 \text{ KPa})$ per un tempo di esposizione di 15 min.

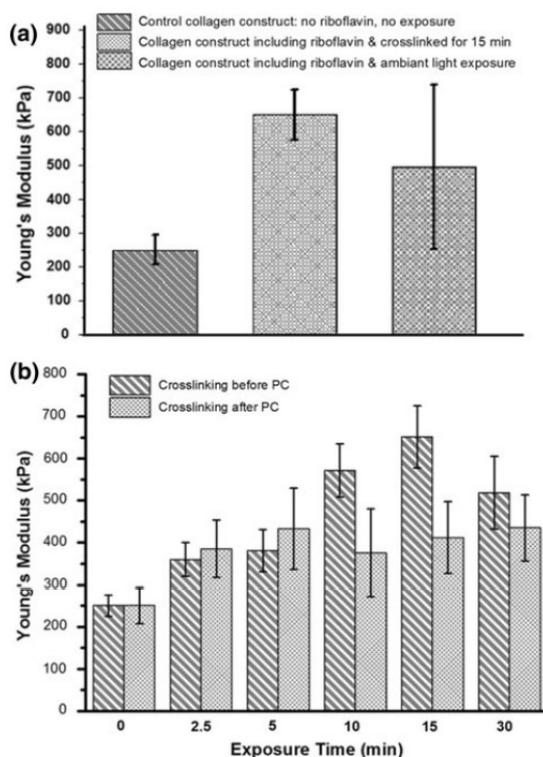


Figura 1.11: a) Valori di controllo del modulo di Young, costrutti di collagene reticolati con RF (15 min esposti alla lampada di attivazione) e reticolati con RF (esposto a luce bianca). b) Valori del modulo di Young dello scaffold in collagene reticolato prima o dopo la fase di compressione plastica. Le barre di errore rappresentano la deviazione standard sul valore medio ($P < 0,05$) [50].

Come si osserva dalla Figura 1.11 la dispersione nei valori dei moduli ottenuti è dovuta al fatto che l'attivazione della reticolazione fotochimica da parte della luce ambientale è un processo incontrollato che produce una reticolazione casuale dei costrutti.

Inoltre, durante la compressione plastica, fino al 95 % dell'acqua interstiziale viene

espulsa dal costrutto di collagene. Questo processo aumenta l'intensità delle forze attrattive interfibrillari (non covalenti, ma ad esempio elettrostatiche) man mano che le fibrille vengono avvicinate l'una all'altra, portando ad un miglioramento delle proprietà meccaniche del costrutto di collagene. Nonostante ciò, la topologia delle fibrille di collagene rimane invariata poiché solo l'acqua interstiziale viene rimossa dal costrutto.

Vitalità cellulare: la riboflavina, ha un effetto dannoso sulle cellule presenti all'interno dello scaffold, a causa della tossicità dell'ossigeno singoletto.

Nel 2007, Ibusuki et al. ha indicato che la vitalità dei condrociti dopo reticolazione fotochimica (in riboflavina 0,25 mM), aumentando il tempo di esposizione da 30 a 60 s, è quasi dimezzata. Questo dimostra che la vitalità cellulare dipende dal tempo di attivazione della riboflavina.

Per una corretta applicazione di questo protocollo, si potrebbe pensare di aumentare la densità di semina prima della reticolazione per garantire la sopravvivenza di un numero sufficiente di cellule o semplicemente seminare lo scaffold solo una volta che è stato reticolato.

Secondo caso di studio: “*Riboflavin and collagen: New crosslinking methods to tailor the stiffness of hydrogels*” di A. Tirella, T. Liberto e A. Ahluwalia [48].

In questo secondo studio, la riboflavina viene utilizzata come specie fotoattivata per promuovere la formazione di legami incrociati chimici in una rete di idrogel di collagene 3D. Gli idrogel a base di collagene sono stati ottenuti utilizzando un metodo di gelificazione in due fasi. In primo luogo è stata utilizzata una fase di gelificazione fisica (ovvero modulazione della temperatura e del pH) per fissare la forma dello scaffold; e successivamente la reticolazione chimica per generare radicali che inducono la formazione di legami incrociati covalenti tra gruppi di amminoacidi nelle catene di collagene, e ottenere quindi una rete 3D stabile.

Protocollo

Idrogel di collagene idratato (HC): il collagene di tipo I è stato estratto dalle code

di ratto e diluito alle concentrazioni finali di 3 e 5 mg/mL con una soluzione 0,02 N di acido acetico. Una soluzione di RF 0,02 % w/v è stata preparata utilizzando acqua distillata. Collagene (850 μL) e RF (50 μL) sono stati quindi pipettati e miscelati delicatamente in 24 piastre multipozzetto a contatto con il ghiaccio. Infine, sono stati aggiunti 100 μL di terreno di coltura cellulare M199 10X (pH 9,4) (con un rapporto collagene: volume medio di 9:1). Per ottenere campioni gelificati sono stati mantenuti a 37 °C per 1 h . Dopo questo primo passaggio, sono stati promossi legami incrociati chimici esponendo i campioni a UV (lunghezza d'onda 265 nm e intensità 10 mJ/cm^2) per 5 min . Come controlli sono stati utilizzati campioni non irradiati e campioni reticolati di glutaraldeide all'1 % v/v .

Idrogel di collagene liofilizzato (FDC): i campioni sono stati prima mantenuti a 4°C per 2 h e poi trasferiti a -20 °C per 24 h . I campioni completamente congelati sono stati liofilizzati (temperatura -50 °C, pressione 180 $mbar$). Per ogni successivo utilizzo i campioni sono stati reidratati prima dell'uso utilizzando 1 mL di PBS per 1 h a temperatura ambiente.

Test di compressione: sono stati utilizzati campioni di forma cilindrica (diametro 14 mm e altezza 4 mm) immersi in PBS. La sonda cilindrica è stata posizionata 2 mm sopra i campioni, evitando qualsiasi contatto prima dell'inizio della misura. È stata impostata una velocità di deformazione a compressione di 0,1 mm/s .

Risultati

Gli idrogel collagene-RF sono stati testati prima e dopo l'irradiazione. L'influenza della concentrazione di collagene e dell'esposizione ai raggi UV è stata misurata utilizzando il test di compressione. Sia nei campioni esposti che in quelli non esposti, la zona lineare considerata per valutare la rigidità risultante era nella regione oltre il 5 % di deformazione.

CAMPIONI	MODULO ELASTICO (KPa)
HC 3mg/ml	2.48±0.14
HC 3mg/ml+UV	3.04±0.26
FDC 3mg/ml+UV	0.90±0.11
HC 5mg/ml	3.38±0.55
HC 5mg/ml+UV	3.60±0.40
FDC 5mg/ml+UV	0.96±0.04

Tabella 1.6: Moduli elastici degli idrogel HC e FDC variando la concentrazione di collagene e il tempo di esposizione ai raggi UV [48].

In Tabella 1.6, sono riportati i valori dei moduli elastici di diversi campioni, valutati nella regione lineare della curva sforzo-deformazione, prima e dopo l'esposizione ai raggi UV e al variare della concentrazione di collagene nella soluzione.

- Nel caso del collagene non esposto, la mobilità della catena proteica è probabilmente dovuta alle interazioni fisiche tra le fibre adiacenti. Questa mobilità causa un valore minore del modulo elastico rispetto a quelli dei campioni esposti alle radiazioni UV.
- Al contrario, una volta che i campioni sono esposti ai raggi UV, la mobilità della catena di collagene è ridotta da legami chimici incrociati, che si riflette in un aumento del modulo elastico degli scaffold.
- Per quanto riguarda la concentrazione di collagene, il test di compressione ha mostrato che essa è rilevante in termini di rigidità dello scaffold stesso. Infatti, concentrazioni di collagene più elevate causano un aumento del valore del modulo elastico, in quanto c'è una maggiore interazione all'interno delle catene polimeriche adiacenti.

Successivamente sono state eseguite altre prove meccaniche di compressione utilizzando diverse velocità di deformazione per analizzare il comportamento viscoelastico del collagene reticolato. Questi test hanno dimostrato che:

- gli scaffold in collagene FDC mostrano un comportamento più elastico rispetto agli idrogel HC: negli scaffold HC la rigidità aumenta con la velocità di compressione mentre rimane costante negli FDC.
- Gli scaffold FDC possiedono un modulo elastico inferiore rispetto ai corrispondenti campioni HC e questo è probabilmente dovuto al minor contenuto complessivo di acqua dei primi.

Questi risultati possono essere osservati in Figura 1.12.

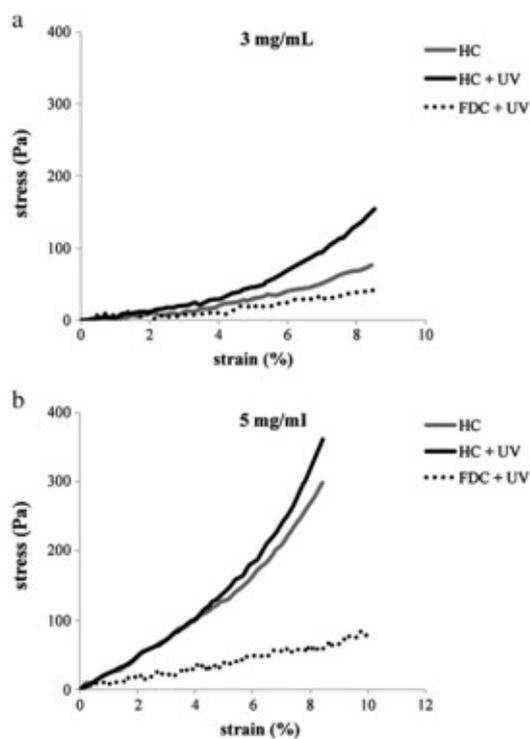


Figura 1.12: Test meccanici su idrogel di collagene-RF: influenza della concentrazione di collagene, dell'esposizione ai raggi UV e della liofilizzazione [48].

Sono state inoltre analizzate la stabilità e la degradazione della struttura dell'idrogel nel tempo mantenendo i campioni immersi in PBS per diversi giorni a temperatura ambiente. La rigidità misurata non cambia significativamente nell'arco di 2 settimane.

Terzo caso in studio: “*Correlating rheological properties and printability of collagen bioinks: the effects of riboflavin photocrosslinking and pH*” di Nicole Diamantides et al. [51].

Questo studio ha l'obiettivo di determinare l'influenza della reticolazione della riboflavina sulle proprietà meccaniche, la cinetica di gelificazione e la capacità di stampa dei bioinchiostri a base di collagene.

Protocollo

Soluzione di collagene: Il collagene di tipo I è stato estratto da tendini ottenuti da code di ratto e solubilizzati in acido acetico 0,1 % w/v alla concentrazione di 1 g per 150 ml di acido acetico per almeno 48 h a 4 °C. Le soluzioni sono state quindi centrifugate a 9000 rpm per 90 min. Il surnatante, contenente collagene solubilizzato, è stato raccolto, congelato e liofilizzato per almeno 96 h. Il collagene liofilizzato è stato quindi ricostituito in acido acetico allo 0,1 % per creare una soluzione di collagene stock a una concentrazione di 15 o 30 mg. Gli idrogel di collagene sono stati fabbricati mescolando la soluzione di collagene stock con una soluzione di lavoro di soluzione salina tamponata con fosfato 1X (PBS), 10X PBS e 1 N NaOH. Alla soluzione di lavoro è stata aggiunta riboflavina 2.0 mM in PBS 1X per ottenere una concentrazione finale di riboflavina di 0,5 mM e una concentrazione finale di collagene di 4, 8 o 12 mg. Nello studio del pH, la concentrazione finale di collagene era di 8 mg e i volumi di 1X PBS e 1 N NaOH nella soluzione di lavoro sono stati variati per ottenere il pH finale desiderato, che variava da 6,1 a 10,1.

Caratterizzazione reologica: Tutti i test di reologia con polimerizzazione UV sono stati eseguiti a temperatura ambiente in modalità oscillatoria a 1 Hz e deformazione

allo 0,5 % con un gap di 1 mm. I moduli di conservazione (G') e di perdita (G'') delle soluzioni di collagene sono stati misurati per 30 s senza UV, seguiti da 10 s con UV e quindi 30 s senza UV.

Risultati

Test reologici. Durante i test reologici dei bioink di collagene con reticolazione con riboflavina, come mostrato in Figura 1.13, sono state osservate tre fasi:

1. una fase iniziale di plateau corrispondente ai 30 s prima dell'esposizione ai raggi UV
2. una fase di crescita corrispondente ai 10 secondi durante l'esposizione ai raggi UV
3. una fase finale di plateau corrispondente ai 30 s dopo l'esposizione agli UV.

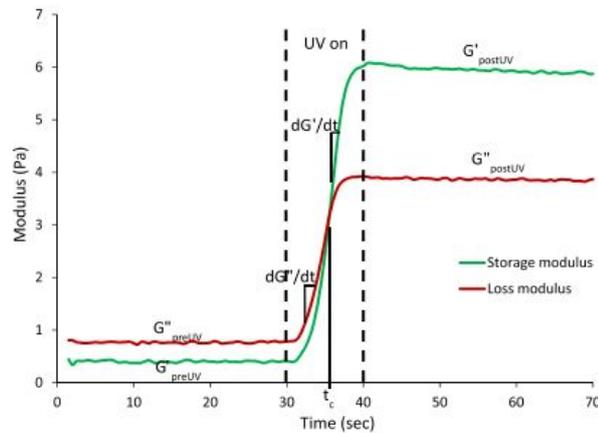


Figura 1.13: Risultati rappresentativi dei test reologici del bioink di collagene con riboflavina [51].

- Prima di essere esposti ai raggi UV, la presenza di riboflavina non ha influenzato il G' del bioink di collagene. Tuttavia, l'aumento della concentrazione di collagene ha aumentato significativamente G' , con un aumento di 3,5 volte da 4 a 8 mg e un aumento di 2,5 volte da 8 a 12 mg.

- Dopo l'esposizione alla luce UV, i campioni contenenti riboflavina hanno registrato un forte aumento di G' , di 12 volte in bioink da 4 mg, di 7 volte in bioink da 8 mg e un aumento di 3,5 volte in bioink da 12 mg rispetto ai livelli di esposizione pre-UV.
- I bioink senza riboflavina a tutte le concentrazioni non hanno riscontrato alcun effetto dopo l'esposizione ai raggi UV.

Nei campioni con riboflavina, il tasso di crescita massimo di G' è stato misurato durante l'esposizione ai raggi UV. Questo tasso di crescita è aumentato con l'aumento della concentrazione di collagene. Tuttavia, il miglioramento meccanico dopo l'esposizione ai raggi UV dovuto alla reticolazione della riboflavina era meno pronunciato a concentrazioni di collagene più elevate.

Il tempo di crossover è risultato diminuire con l'aumentare delle concentrazioni di collagene.

- Nei bioink da 4 mg, la gelificazione si verifica 5,75 s dopo l'inizio dell'esposizione ai raggi UV.
- Nei bioink da 8 mg e 12 mg, la gelificazione avviene rispettivamente dopo 3,25 s e 1,75 s.

Studio sul pH: il modulo di conservazione dopo la gelificazione e il tasso di crescita del modulo di conservazione durante la gelificazione dei bioinchiostri di collagene dipendono fortemente dal pH. Il G'_{∞} medio per gli intervalli di pH 7,5–8,0 e 8,0–8,5 era più di 2 volte maggiore del G'_{∞} dell'intervallo di pH di controllo 7,0–7,5.

Combinando i risultati degli studi sulla riboflavina e sul pH, hanno scoperto che il modo migliore per migliorare la stampabilità dei bioinchiostri di collagene è aumentare il modulo di conservazione dell'inchiostro prima dell'estrusione.

Citotossicità: La vitalità cellulare era elevata (>95 %) a tutte le concentrazioni di collagene testate. Tuttavia, l'aggiunta di reticolazione con riboflavina attivata

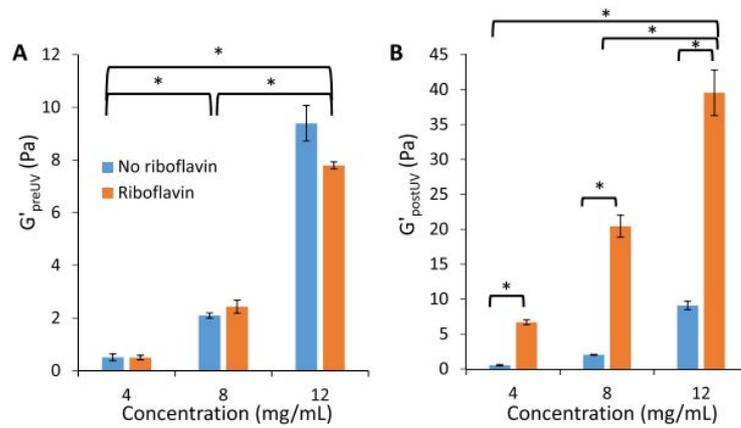


Figura 1.14: Proprietà reologiche dei bioink di collagene prima, durante e dopo l'esposizione ai raggi UV, con e senza riboflavina. (A) G' di bioink prima dell'esposizione ai raggi UV. (B) G' di bioink dopo 10 s di esposizione alla luce UV [51].

dalla luce blu ha ridotto la vitalità al 76 %-77 %. La concentrazione di collagene non ha influenzato la vitalità cellulare con o senza riboflavina.

TECNICA	METODO	STAMPA	RISOLUZIONE	VISCOSITA' MATERIALE	CELLULE
Stampa a getto di inchiostro	Disposizione gocce di bioink generate da impulsi di pressione indotti da variazioni termiche o piezoelettriche	Elevata velocità di stampa. Non possono stampare strutture verticali funzionali	Relativamente bassa	Bassa	Basse concentrazioni di cellule per evitare l'intasamento dell'ugello
Stampa laser assistita	Trasferimento bioink da un substrato donatore ad uno ricevente posto direttamente sotto. Trasferimento controllato da impulsi di raggio laser. Goccioline di dimensioni definite in base all'energia assorbita	Non possono stampare rapidamente scaffold voluminosi	Elevata	Alta	Elevata densità cellulare
Stampa per estrusione	Bioink erogato da una forza pneumatica o meccanica in modo continuo su substrati sterili	Velocità di stampa elevata	Circa 200-1000 µm	Alta	Elevata densità cellulare, ma vitalità compromessa da stress di taglio

50
Tabella 1.3: Principali tecniche di stampa 3D nell'ingegneria tissutale [30][31][33].

Capitolo 2

Scopo della tesi

Dopo aver analizzato e discusso i vantaggi dovuti all'utilizzo dei modelli 3D *in vitro* per studiare i meccanismi delle patologie polmonari e l'azione dei farmaci sull'organismo, l'obiettivo finale di questo lavoro di tesi è la realizzare di un modello 3D *in vitro* di polmone sfruttando la tecnica di bioprinting 3D.

Come materiale per la stampa verrà utilizzato un idrogelo a base di collagene dal momento che è la proteina maggiormente presente all'interno del tessuto polmonare, oltre ad avere ottime proprietà di biodegradabilità e di biocompatibilità.

Per replicare la funzione dei tessuti nativi che possono essere utilizzati per l'ingegneria dei tessuti o la medicina rigenerativa, la chiave è il processo di fibrillogenesi *in vitro* del collagene.

La fibrillogenesi del collagene dà origine a strutture macromolecolari a tripla elica con resistenza meccanica favorevole in tutte e tre le dimensioni.

Funzionalmente, le reti di fibre di collagene agiscono per resistere a deformazioni elevate e nel processo trasmettono forze, dissipano energia e prevengono guasti meccanici prematuri dei tessuti.

Il fenomeno di fibrillogenesi verrà studiato inizialmente tramite il metodo della torbidità, mentre, per monitorare la formazione di fibrille verrà utilizzata la spettroscopia a fluorescenza, sfruttando l'aggiunta di thioflavina T alla soluzione di collagene.

Per una completa caratterizzazione delle proprietà meccaniche e fisiche dell'idrogelo

a base di collagene, e quindi, per garantire scaffold adatti per applicazioni di ingegneria tissutale, saranno svolti test di *swelling*, di degradazione e test reologici. Inoltre, per migliorare le proprietà meccaniche del collagene e fornire integrità strutturale per la stampa di modelli 3D, verrà aggiunta la riboflavina alla soluzione di collagene e saranno valutati gli effetti che comporta sulle proprietà del collagene stesso. Successivamente, saranno introdotte delle cellule, in particolare dei fibroblasti derivati dallo stroma della parete alveolo-capillare, all'interno dell'idrogelo prima che avvenga la fibrillogenasi.

Verranno valutate diverse densità cellulari al fine di poter scegliere la più adeguata e attraverso i test di LIVE/DEAD sarà dimostrata la vitalità delle cellule all'interno dell'idrogelo di collagene.

Infine, verranno eseguite delle prove preliminari di stampa per dimostrare la stabilità dell'idrogelo e il suo potenziale come bioinchiostro per ottenere strutture 3D cellularizzate.

In particolare, verranno testati due differenti metodi di stampa per la realizzazione degli scaffold: il primo metodo prevede la stampa dell'idrogelo di collagene allo stato gel, mentre, nel secondo metodo verrà aggiunta la riboflavina alla soluzione di collagene e il bioinchiostro verrà stampato allo stato sol. La transizione allo stato gel verrà indotta solo una volta che il filamento sarà estruso, settando la temperatura del piatto su cui verrà stampato pari a 37 °C.

Capitolo 3

Materiali e metodi

3.1 Soluzione di collagene

3.1.1 Componenti della soluzione

Collagene di tipo I

	Azienda produttrice	Blafar Ltd.
	Nome prodotto	Polvere di collagene bovino di tipo I
	Forma	Polvere di collagene di tipo I
	Purezza	> 85 %
	pH	2.0 - 3.0
	Solubilità	10 mg/mL in HCl refrigerato (< 1 mM) o acqua purificata refrigerata priva di endotossine

Tabella 3.1: Polvere di collagene di tipo I, descrizione del prodotto [52].

In questo lavoro di tesi, per il bioinchiostro è stato utilizzato il collagene di tipo I liofilizzato di origine bovina, ottenuto da Blafar Ltd. [52]. L'Atelocollagene di tipo I di Blafar viene estratto dai tendini d'Achille di bovini e viene trattato per ridurre al minimo la contaminazione da virus ed endotossine.

Come riportato all'interno della scheda tecnica fornita dal produttore, il materiale

si presenta sotto forma di polvere bianca e risulta solubile a pH acido e a basse temperature (circa 4-5°C) [52]. Nella Tabella 3.1, sono riassunte brevemente le principali caratteristiche tecniche del collagene.

MEM

Il terreno di coltura utilizzato negli esperimenti è il MEM (Minimum Essential Medium) [53]. Esso è ampiamente utilizzato per supportare la crescita di diverse cellule di mammifero.

Il terreno di coltura è fondamentale per mantenere la vitalità cellulare in quanto contiene gli elementi nutritivi che le cellule non sono in grado di sintetizzare autonomamente e che risultano essere necessari per la loro sopravvivenza.

All'interno del MEM non sono contenute proteine, lipidi o fattori di crescita, pertanto richiede un'integrazione, che comunemente viene effettuata con il 10 % di siero fetale bovino (FBS) [53]. Il MEM utilizza un sistema tampone bicarbonato di sodio (2.2 g/l), e pertanto richiede un ambiente di CO_2 5-10 % per mantenere il pH fisiologico.

La Tabella riportata sotto, 3.2, riassume le principali caratteristiche del materiale.

	Azienda produttrice	Thermo Fisher Scientific
	Nome prodotto	Minimum Essential Medium (MEM)
	Forma	Liquida

Tabella 3.2: MEM, descrizione del prodotto [53].

Acido acetico

Un altro materiale impiegato nel presente lavoro è l'acido acetico prodotto dall'azienda Sigma-Aldrich [54], le cui caratteristiche sono riassunte nella Tabella 3.3. L'acido acetico è un acido carbossilico sintetico con proprietà antibatteriche e antimicotiche. È un liquido igroscopico, corrosivo con un odore simile all'aceto.

L'acido acetico glaciale è l'acido acetico anidro ed è ampiamente impiegato come solvente per varie reazioni di ossidazione [54].

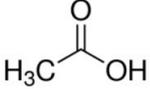
	Azienda produttrice	Sigma – Aldrich
	Nome prodotto	Glacial acetic acid
	Forma	Liquida
	Purezza	> 99.70 %

Tabella 3.3: Acido Acetico, descrizione del prodotto [55].

Idrossido di sodio

L'idrossido di sodio (NaOH) noto anche come soda caustica è una base inorganica solubile in acqua. E' stato utilizzato come soluzione tampone per regolare il *pH* della soluzione [56].

Nella Tabella 3.4 sono riepilogate le caratteristiche principali del prodotto utilizzato.

	Azienda produttrice	Sigma – Aldrich
	Nome prodotto	Idrossido di sodio
	Forma	Pellet
	Sinonimi	Soda caustica
	Solubilità	1.260 g/L a 20 °C in H ₂ O

Tabella 3.4: Idrossido di sodio, descrizione del prodotto [56].

3.1.2 Preparazione della soluzione a base di collagene

In Figura 3.1, sono rappresentate le varie fasi di preparazione della soluzione a base di collagene di tipo I.

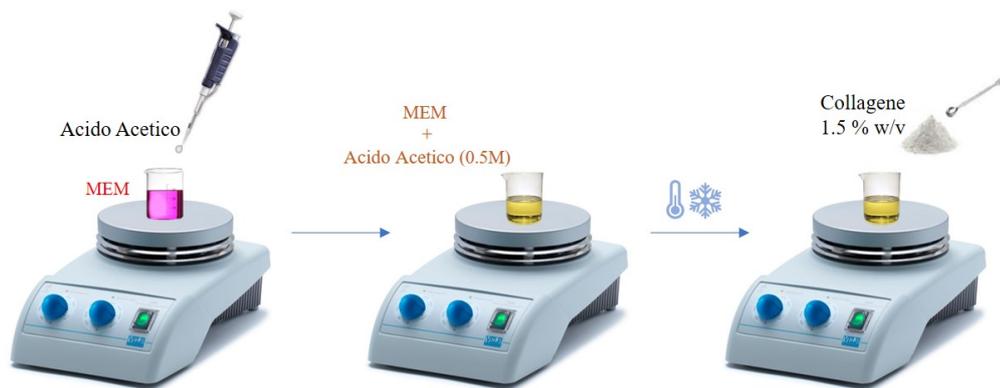


Figura 3.1: Preparazione della soluzione a base di collagene. Rappresentazione schematica dei passaggi operativi effettuati e degli strumenti e materiali utilizzati.

1. Il primo step richiede la scelta del volume e della concentrazione finale della soluzione di collagene, dal momento che la massa del collagene stesso da utilizzare dipende dal valore di queste due quantità. Si può quindi procedere con la miscelazione dei solventi MEM e Acido Acetico ($0,5 M$), ottenendo in tal modo una soluzione con pH acido ($pH < 4$).
2. Successivamente si posiziona la soluzione su uno stirrer (velocità di rotazione di circa $\sim 100 rpm$) per mantenere il sistema in agitazione. Per assicurare una temperatura inferiore a $9^{\circ}C$, in modo tale da favorire la solubilità del collagene, si mantiene la soluzione all'interno di un cristallizzatore riempito di ghiaccio per tutta la durata dell'esperimento.
3. Si procede con l'aggiunta graduale della polvere di collagene ($1.5 \% w/v$), precedente pesata, alla soluzione acida.
4. Conclusa questa operazione si ricopre il becher con alluminio e lo si lascia in agitazione almeno per $12 h$ in frigorifero. In questo modo, si favorisce la completa dispersione del collagene in soluzione, in modo tale da ottenere una soluzione omogenea.
5. Dopo essersi assicurati che la soluzione sia omogenea, si procede con la sua neutralizzazione, come si osserva in Figura 3.2.
Per ottenere un pH neutro (di valore ~ 7.6) bisogna aggiungere gradualmente

NaOH (10 M) alla soluzione con l'aiuto di una pipetta e contemporaneamente misurare il pH servendosi di un pHmetro.

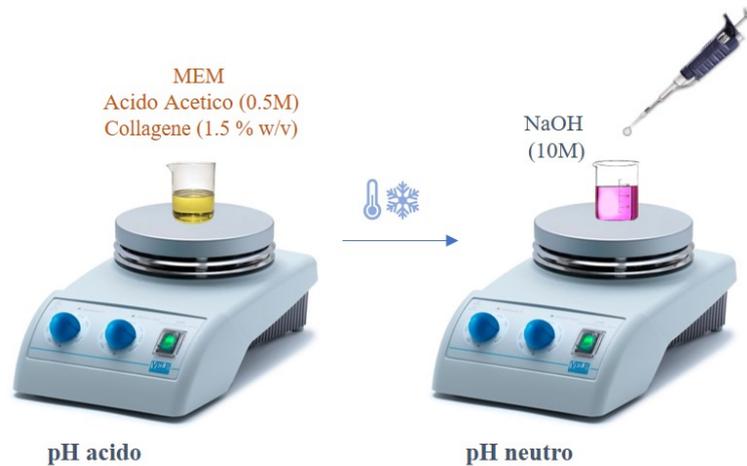


Figura 3.2: Neutralizzazione della soluzione a base di collagene

Durante il processo di neutralizzazione si può stimare anche ad occhio nudo il cambiamento di pH della soluzione di collagene. Infatti, il colore della soluzione cambia da giallo (pH acido) all'arancione rosato (pH neutro). Il cambiamento di colore è dovuto alla presenza di un colorante rosso fenolo all'interno del terreno di coltura. Questo colorante è un indicatore di pH e risulta giallo a pH acido, arancio a pH neutro, rosso a pH maggiori di 7.4 e violaceo a pH molto alti [29].

3.2 Caratterizzazione soluzione di collagene

Per una completa caratterizzazione delle proprietà meccaniche e fisiche dell'idrogelo a base di collagene sono stati svolti test reologici, di *turbidity*, di fluorescenza, di *swelling* e di degradazione.

3.2.1 *Swelling*

Le prove di *swelling* permettono di analizzare la capacità dell'idrogelo di collagene di inglobare acqua all'interno del proprio reticolo.

Tutti i campioni utilizzati per effettuare queste analisi sono stati preparati all'interno di bijoux ad una concentrazione di collagene pari all'1.5 % w/v, in 500 μ l di MEM e acido acetico. I campioni sono stati neutralizzati con NaOH e posti in incubatore a 37°C per 20 minuti in modo da indurre la transizione dallo stato sol a quello di gel.

Successivamente, è stato misurato il peso di ciascun campione e in ognuno è stato aggiunto un volume di soluzione tampone fosfato salino (PBS) pari ad 800 μ l (Figura 3.3).

I campioni sono stati pesati ad intervalli di 24 h e 72 h.



Figura 3.3: Immagine relativa ai 3 campioni di collagene dopo la transizione in gel e l'aggiunta di PBS.

3.2.2 Componenti della soluzione a base di collagene e thioflavina

Thioflavina T

La Thioflavina T (ThT) è un colorante fluorescente della famiglia dei benzotiazolo, ampiamente utilizzato per monitorare la formazione di fibrille di collagene [46]. Nella Tabella 3.5 sono riportate le principali caratteristiche della ThT utilizzata in questo lavoro.

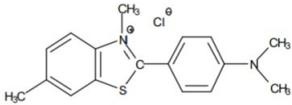
	Azienda produttrice	Sigma – Aldrich
	Nome prodotto	Thioflavin T
	Forma	Una polvere dal giallo all'arancio-marrone
	Solubilità	Fino a 100 mg/mL in H_2O

Tabella 3.5: Thioflavina T, descrizione del prodotto [57].

3.2.3 Protocollo soluzione di lavoro collagene-ThT

In Figura 3.4 sono rappresentate le varie fasi di preparazione della soluzione a base di collagene e thioflavina:

1. Il primo step richiede la scelta del volume e della concentrazione finale della soluzione di collagene e thioflavina, dal momento che la massa del collagene e di ThT da utilizzare dipende dal valore di queste due quantità. Si può quindi procedere con la diluizione della polvere di ThT in MEM e acido acetico per ottenere una soluzione con concentrazione stock di 2 mg/ml e pH acido ($pH < 4$).
2. Successivamente si posiziona la soluzione su uno stirrer per mantenere il sistema in agitazione e si diluisce la soluzione stock in MEM e acido acetico per ottenere una concentrazione di lavoro pari a 0.5 mM .
3. Si procede con l'aggiunta graduale della polvere di collagene (1.5% w/v), precedentemente pesata, alla soluzione acida.
Per assicurare una temperatura inferiore a 9°C si mantiene la soluzione all'interno di un cristallizzatore riempito di ghiaccio per tutta la durata dell'esperimento.
4. Conclusa questa operazione si ricopre il becher con alluminio e lo si lascia in agitazione almeno per 12 h in frigorifero. In questo modo si favorisce la completa dispersione del collagene in soluzione, ottenendo così una soluzione omogenea.

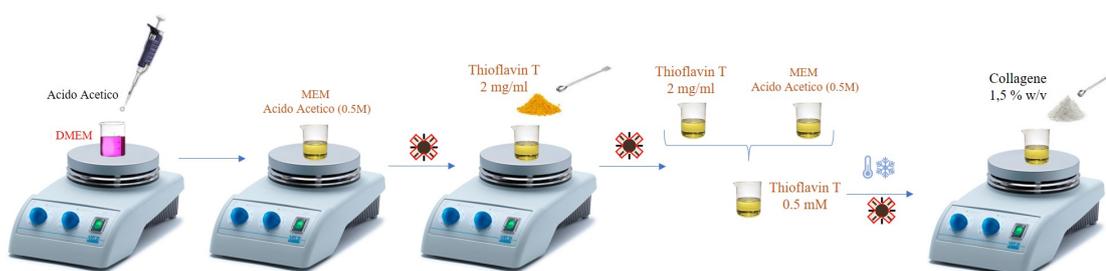


Figura 3.4: Preparazione della soluzione di tioflavina alla concentrazione di 0.5 mM. Rappresentazione schematica dei passaggi operativi effettuati e degli strumenti e materiali utilizzati.

5. Dopo essersi assicurati che la soluzione sia omogenea, si procede con la sua neutralizzazione, aggiungendo gradualmente NaOH (10 M) alla soluzione fino ad ottenere un *pH* con valore di circa 7.6.

Considerazioni



Figura 3.5: Soluzione di collagene e tioflavina, a pH acido, prima della centrifugazione.



Figura 3.6: Soluzione di collagene e tioflavina, a pH acido, dopo la centrifugazione.

È importante lavorare proteggendo la soluzione di ThT dall'esposizione alla luce, coprendo il becher con fogli di alluminio o lavorando con contenitori non trasparenti, per evitare la fotodegradazione del colorante.

Inoltre, poichè la soluzione di collagene e tioflavina presenta molte bolle, come

mostrato nella Figura 3.5, si centrifuga la soluzione stessa a 3000 *rpm* per 5 minuti, ottenendo una soluzione priva di bolle come in Figura 3.6.

3.2.4 Lettore di micropiastre

Un lettore di micropiastre rileva i segnali luminosi prodotti dai campioni che sono stati pipettati in una multiwell.

Le proprietà ottiche di questi campioni sono il risultato di una reazione biologica, chimica, biochimica o fisica [58].

Il lettore di micropiastre multimodale Varioskan LUX di Thermo Scientific, in Figura 3.7, permette di effettuare misure di assorbanza, intensità di fluorescenza e luminescenza.

In particolare, in questo lavoro di tesi sono stati effettuate letture dello spettro di emissione in fluorescenza delle soluzioni di collagene e collagene e thioflavina, impostando una lunghezza d'onda di eccitazione pari a 421 *nm* e una lunghezza d'onda di emissione pari a 485 *nm*.

Invece, per la lettura delle curve *turbidity-tempo* della soluzione di collagene a pH neutro, l'assorbanza è stata impostata ad una lunghezza d'onda pari a 310 *nm*.

Inoltre, per le misure di fluorescenza è stata utilizzata una multiwell con fondo nero, mentre, per le misure di assorbanza una multiwell con fondo trasparente.

Le misurazioni effettuate sono riportate di seguito:

- Spettri di emissione in fluorescenza delle soluzioni ThT/coll e collagene a pH acido;
- Spettro di emissione in fluorescenza della soluzione ThT/coll a pH 7;
- Spettro di emissione in fluorescenza della soluzione ThT a pH 7 dopo averla posta in un incubatore a 37°C per 20 minuti;
- Spettro di assorbanza della soluzione di collagene a pH neutro. Durante lo svolgimento della prova è stato impostato un aumento graduale della temperatura da 0°C a 37°C.



Figura 3.7: Lettore di micropiastre multimodale Varioskan LUX di Thermo Scientific.

3.2.5 Misurazioni di *turbidity*

La cinetica della fibrillogenesi del collagene è comunemente monitorata mediante la misurazione della torbidità [45].



Figura 3.8: Lettura dello spettro di assorbanza della soluzione di collagene con il lettore di micropiastre multimode ad assorbanza.

Per questo esperimento sono stati preparati 1,5 *ml* di soluzione di collagene alla concentrazione di 1.5 % w/v, a pH neutro, come descritto precedentemente. Successivamente, si sono aggiunti 100 μ l di soluzione in 3 pozzetti differenti di una

multiwell trasparente ed è stato letto lo spettro di assorbanza tramite l'utilizzo del lettore di micropiastre multimode ad assorbanza, come si osserva dalla Figura 3.8. E' stato impostato un incremento della temperatura, durante il test, da 0°C a 37°C, in modo tale da consentire la transizione della soluzione di collagene dallo stato sol a quello gel.

3.2.6 Componenti della soluzione a base di collagene e riboflavina

Riboflavina

Per migliorare la qualità di stampa dell'idrogelo a base di collagene, vengono preparate diverse soluzioni di collagene con concentrazioni diverse di riboflavina. Numerosi studi, infatti, hanno dimostrato che la stabilità meccanica dell'idrogelo di collagene può essere migliorata attraverso l'aggiunta di riboflavina attivata dalla luce UV [48][49].

La riboflavina è una vitamina B2 biocompatibile che ha mostrato una citotossicità minima rispetto ai fotoiniziatori utilizzati convenzionalmente come ad esempio la glutaraldeide e la formaldeide.

Nella riboflavina la reticolazione risulta dalla formazione del legame covalente tra l'amminoacido della fibrilla di collagene e l'ossigeno singoletto generato dalla riboflavina eccitata dalla luce blu [48][49].

In Tabella 3.6 sono riportate le principali specifiche tecniche della riboflavina utilizzata.

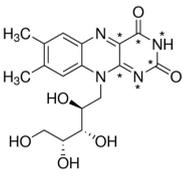
	Azienda produttrice	Sigma – Aldrich
	Nome prodotto	Riboflavin
	Forma	Una polvere dal giallo all'arancio
	Solubilità	10 mg/ml, 0.1 M NaOH

Tabella 3.6: Riboflavina, descrizione del prodotto [59].

3.2.7 Protocollo soluzioni di lavoro collagene-RF

In Figura 3.9 sono rappresentate le varie fasi di preparazione della soluzione a base di collagene e riboflavina.

1. Il primo step consiste nella scelta del volume e della concentrazione finale della soluzione stock di riboflavina (2.0 mM). In seguito si procede con la miscelazione dei solventi MEM e Acido Acetico (0.5M) ottenendo in tal modo una soluzione che risulterà acida ($\text{pH} < 4$).
2. Successivamente si posiziona la soluzione su uno stirrer (velocità di rotazione $\sim 250\text{ rpm}$) per mantenere il sistema in agitazione e si procede con l'aggiunta della riboflavina in polvere precedentemente pesata. Inoltre, per evitare la fotodegradazione della riboflavina, la soluzione deve essere mantenuta al buio.



Figura 3.9: Preparazione della soluzione di riboflavina al 2 % w/v. Rappresentazione schematica dei passaggi operativi effettuati e degli strumenti e materiali utilizzati.

3. Per ottenere la soluzione di lavoro con concentrazione finale di riboflavina pari a 0.5 mM , si diluisce la soluzione stock di riboflavina in MEM e acido acetico.

Ottenuta la soluzione di riboflavina con concentrazione 0.5 mM , si procede come segue:

1. Si aggiunge alla soluzione la polvere di collagene, mantenendo la soluzione stessa ad una temperatura inferiore ai 9°C . Successivamente, si ricopre il becher con alluminio e si lascia in agitazione almeno per 12 h in frigorifero,

in modo tale da favorire la completa dispersione del collagene e ottenere così una soluzione omogenea.

2. Dopo essersi assicurati che la soluzione sia omogenea, si procede con la sua neutralizzazione, come si osserva in Figura 3.10. Si aggiunge gradualmente NaOH (10 M) alla soluzione e si misura il pH con il pHmetro, fino ad ottenere una soluzione con un valore di pH di circa 7.6.



Figura 3.10: Preparazione della soluzione a base di collagene e riboflavina. Neutralizzazione della soluzione.

3.2.8 Reometro

Il reometro è uno strumento utilizzato per misurare le proprietà reologiche dei fluidi, in condizioni stazionarie, dinamiche ed oscillatorie.

In commercio sono presenti reometri con diverse configurazioni, ma i più comuni sono: i reometri capillari e quelli rotazionali.

Nei reometri capillari il fluido scorre all'interno di un tubo di sezione circolare a causa della differenza di pressione che si genera tra ingresso ed uscita dello stesso. I reometri capillari effettuano misure di viscosità per valutare le proprietà di scorrimento del campione.

I reometri rotazionali, invece, presentano due piastre: una fissa e l'altra mobile. Il caricamento del campione viene effettuato tra le due piastre. Il motore aziona, applicando una coppia, aziona la piastra mobile che può presentare diverse geometrie (solitamente piatta o conica). Il campione può subire un'azione rotatoria o oscillatoria [29].

Un reometro rotazionale permette la misurazione di alcune grandezze come: la coppia, la velocità angolare e lo spostamento angolare. Queste vengono convertite in sollecitazione, deformazione, viscosità, velocità di deformazione e modulo di elasticità e di perdita.

I reometri moderni oggi sono in grado di raggiungere varie temperature in modo rapido e preciso grazie a vari dispositivi di controllo della temperatura [29].

In questo lavoro di tesi, per valutare le proprietà reologiche dell'idrogel a base di collagene, con e senza riboflavina, è stato utilizzato il reometro automatico MCR SERIES ANTON PAAR [60], disponibile presso il laboratorio Interdipartimentale del Politecnico di Torino (Figura 3.11), in configurazione piatto-piatto. Questo tipo di strumento permette di studiare sistemi fotosensibili grazie alla base in vetro trasparente, al di sotto della quale si può installare la fibra che emette la radiazione [29].

Il piatto superiore applica uno sforzo di taglio sulla soluzione durante i test.



Figura 3.11: Reometro MCR SERIES ANTON PAAR [60].

I test reologici permettono lo studio di sistemi che possiedono sia una componente elastica che una componente viscosa.

La maggior parte dei materiali biologici presenta entrambe le proprietà, e per questo motivo vengono definiti viscoelastici.

Il reometro permette di separare la risposta elastica, in fase con lo stress applicato,

dalla risposta viscosa, che invece possiede un certo ritardo di fase.

In particolare, sono stati effettuati i seguenti test:

- **Time test:** permette di determinare il tempo di gelificazione dell'idrogelo. Inizialmente, il campione in fase sol, è posizionato sul piatto inferiore, la cui temperatura è stata precedentemente portata a 0°C in modo da evitare la reticolazione della soluzione di collagene. Durante lo svolgersi della prova, è stato impostato un incremento graduale della temperatura da 0°C a 37°C , in modo tale da consentire la transizione dell'idrogelo dallo stato sol a quello gel. La frequenza è stata mantenuta costante a 1 Hz e l'ampiezza dello sforzo è aumentata gradualmente da 0.01 a 500% .
- **Strain test:** permette di determinare la regione viscoelastica lineare (LVE) dell'idrogelo. Durante lo svolgimento del test, l'ampiezza dello sforzo è mantenuta pari a all'1 %, la frequenza a 1 Hz .
- **Frequency test:** valuta la cinetica di transizione del campione dallo stato sol a quello gel. Nella regione viscoelastica lineare (LVE), la dipendenza dalla frequenza dei moduli dinamici G' e G'' può essere utilizzata per dedurre molti aspetti importanti della struttura del gel e del suo comportamento meccanico. Infatti, se il modulo di elasticità G' è maggiore del modulo di perdita G'' , il campione è nello stato di gel; viceversa, se $G' < G''$, il campione è nello stato sol. Oppure, se il campione è bifasico (sia sol sia gel), la transizione si ha nel punto di crossover.
Durante la prova viene mantenuta costante la deformazione (ampiezza pari all'1 %), mentre, viene gradualmente variata la frequenza in un range definito dal limite di linearità ($0.1 - 100\text{ rad/s}$).

Per ciascuna prova sono stati utilizzati campioni contenenti solo collagene, ma a diverse concentrazioni (1 % e 1.5 % w/v), e campioni contenenti collagene e riboflavina alla concentrazione di 0.5 mM , preparati come descritto precedentemente. Inoltre, nel caso dei campioni contenenti riboflavina, questi sono stati irradiati con luce UV per verificare se la riboflavina avesse un'influenza sulla transizione dell'idrogelo di collagene dallo stato sol a quello gel.

I dati delle diverse prove sono stati esportati su Excel in modo tale da poterli elaborare e rappresentare graficamente.

3.3 Cellularizzazione del bioinchiostro

3.3.1 Colture cellulari: MRC-5

Per questo studio è stata utilizzata la linea cellulare MRC-5 (Figura 3.12), ovvero una linea di coltura cellulare diploide composta da fibroblasti. Quest'ultima deriva originariamente dal tessuto polmonare di un feto maschio caucasico abortito di 14 settimane. La linea è stata isolata da JP Jacobs e colleghi nel 1966 [61].

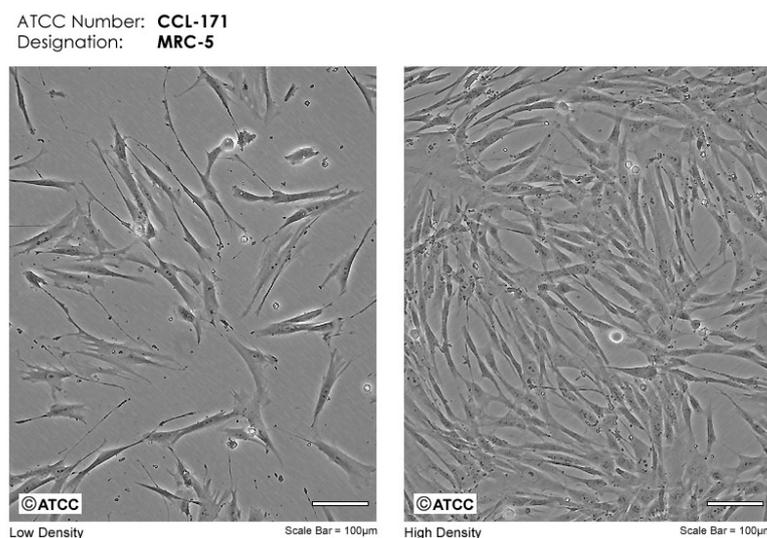


Figura 3.12: Visualizzazione al microscopio della linea cellulare MRC-5. Le due immagini rappresentano le cellule a diversi giorni di coltura [61]

Le cellule MRC-5 sono attualmente utilizzate per produrre diversi vaccini tra cui l'epatite A, la varicella e la poliomielite [61].

Nella Tabella 3.7 ne sono riepilogate le caratteristiche.

Organismo	<i>Homo sapiens</i> , umano
Tipo di cellule	Fibroblasti
Tessuto	Polmone
Anni	14 settimane di gestazione
Genere	Maschile
Proprietà di crescita	Cellule aderenti
Formato del prodotto	Congelato

Tabella 3.7: MRC-5, descrizione del prodotto [61].

3.3.2 Materiali e strumenti per le colture cellulari

DMSO

Congelamento delle cellule

Per il congelamento delle cellule il crioprotettore più utilizzato è il DMSO (Dimetilsolfossido). Questo materiale permette di:

- Ridurre lo stress osmotico sulle cellule durante il congelamento e lo scongelamento.
- Contrastare lo shock osmotico.
- Proteggere le cellule anche riducendo la disidratazione e il restringimento cellulare durante il processo di congelamento.

Per congelare le cellule queste si sospendono in 90 % FBS (Fetal bovine serum) e 10 % DMSO e si pongono nella cella frigorifera a -86°C .

Scongelamento delle cellule

Dopo lo scongelamento delle cellule, il DMSO deve essere rimosso dalla sospensione di cellule mediante lavaggio per centrifugazione (1000 *rpm* per 8 minuti), in quanto è potenzialmente citotossico per le cellule stesse.

Pertanto, per evitare il contatto prolungato con il DMSO, lo scongelamento delle cellule deve avvenire molto rapidamente, agitandole delicatamente in un bagnetto a 37°C. Per lo stesso motivo, dopo l'aggiunta di DMSO, deve essere subito avviato il processo di congelamento delle cellule.

Per congelare le cellule queste si sospendono in 90 % FBS (Fetal bovine serum) e 10 % DMSO e si pongono nella cella frigorifera a -86°C.

	Azienda produttrice	Thermo Fisher Scientific
	Nome prodotto	Dimethylsulfoxide (DMSO)
	Forma	Liquida

Tabella 3.8: DMSO, descrizione del prodotto [62].

FBS

Il FBS fornisce fattori di crescita essenziali per il mantenimento e la crescita delle cellule in coltura [63]. In Tabella 3.9 sono riepilogate le caratteristiche dell'FBS impiegato durante lo studio.

	Azienda produttrice	Thermo Fisher Scientific
	Nome prodotto	Fetal bovine serum (FBS)
	Forma	Liquida

Tabella 3.9: FBS, descrizione del prodotto [63].

Penicillina/Streptomicina

Nelle colture cellulari le principali contaminazioni che possono verificarsi sono: la contaminazione delle colture cellulari con organismi microbiologici e la contaminazione di una linea cellulare con un'altra.

Entrambi i tipi di contaminazione sono estremamente diffusi e l'impatto sui risultati non può essere sottovalutato. Per questo motivo, nelle colture cellulari si utilizzano antibiotici e antimicotici, in modo tale da prevenire la contaminazione.

Gli antibiotici penicillina e streptomicina sono utilizzati per prevenire la contaminazione batterica delle colture cellulari grazie alla loro efficace azione combinata contro i batteri gram-positivi e gram-negativi.

La penicillina agisce interferendo direttamente con il turnover della parete cellulare batterica e indirettamente innescando il rilascio di enzimi che alterano ulteriormente la parete cellulare.

La streptomicina agisce legandosi alla subunità 30S del ribosoma batterico, portando all'inibizione della sintesi proteica e alla morte nei batteri [64].

In Tabella 3.10 sono riepilogate le principali caratteristiche della penicillina/streptomicina utilizzata durante questo lavoro [64].

	Azienda produttrice	Thermo Fisher Scientific
	Nome prodotto	Penicillina/Streptomicina
	Forma	Liquida
	Tipo di prodotto	Antibiotico
	Concentrazione	100X
	Applicazione convalidata	Prevenzione della contaminazione delle colture cellulari

Tabella 3.10: Penicillina/Streptomicina, descrizione del prodotto [64].

Tripsina

La tripsina è ampiamente utilizzata per la dissociazione cellulare, per le subcolture cellulari e la dissociazione dei tessuti primari. Infatti, quest'ultima degrada le proteine della matrice che mantengono le cellule aderite alla superficie [65].

In Tabella 3.11 sono riassunte le principali caratteristiche della tripsina utilizzata.

	Azienda produttrice	Thermo Fisher Scientific
	Nome prodotto	Trypsin-EDTA (0.25%)
	Forma	Liquida
	Origine	Origine animale
	pH	7.1 a 8
	Concentrazione	1X
	Tipo di prodotto	Reagente di dissociazione della coltura cellulare
	Osmolarità	270-320 mOsm/kg

Tabella 3.11: Tripsina, descrizione del prodotto [65].

Cappa a flusso laminare

La cappa a flusso laminare fornisce un luogo di lavoro asettico per le colture cellulari e una protezione dagli aerosol per l'operatore.

Per sterilizzare la superficie è necessario accendere i raggi UV prima e dopo l'esecuzione del lavoro.

Incubatore

L'incubatore fornisce un ambiente rigorosamente controllato per lo sviluppo delle colture cellulari. La temperatura è mantenuta a 37°C, l'umidità al 95 % e i livelli di CO_2 al 5 %.

Centrifuga

Questo strumento viene utilizzato per rimuovere il DMSO presente all'interno delle cellule. Infatti, dopo la centrifugazione il pellet cellulare si posa sul fondo ed è quindi possibile rimuovere il surnatante.



Figura 3.13: Centrifuga.

Microscopio ottico invertito

Per osservare la confluenza e l'eventuale contaminazione delle colture cellulari, quest'ultime devono essere osservate tramite l'utilizzo di un microscopio ottico invertito. La luce proviene dall'alto mentre l'obiettivo è posizionato in basso.



Figura 3.14: Microscopio ottico invertito.

Camera di Burker

La camera di Burker consente la conta diretta, tramite l'impiego di un microscopio, delle cellule contenute all'interno di un volume noto di campione (Figura 3.15). Questa è costituita da un vetro sospeso, in cui si ricava una camera capillare. La parte superiore della camera è costituita da un vetrino bloccato da due graffe laterali. Al microscopio diventano evidenti una serie di linee ortogonali tra loro,

che definiscono una serie di aree, e quindi di volumi. La media delle cellule che si contano nei 4 quadrati viene moltiplicata per un valore fisso pari a 10^4 (poiché ogni quadrato rappresenta un volume totale di 0.1mm^3) e si ottiene il numero di cellule presenti in 1 ml di soluzione tramite la seguente formula:

$$N_{tot} = \frac{N_{cellule}}{4} \times 10^4 \quad (3.1)$$

dove N_{tot} rappresenta indicativamente il numero di cellule totali presenti all'interno della soluzione ed $N_{cellule}$ il numero di cellule presenti all'interno del campione posizionato sul vetrino della camera di Burker.

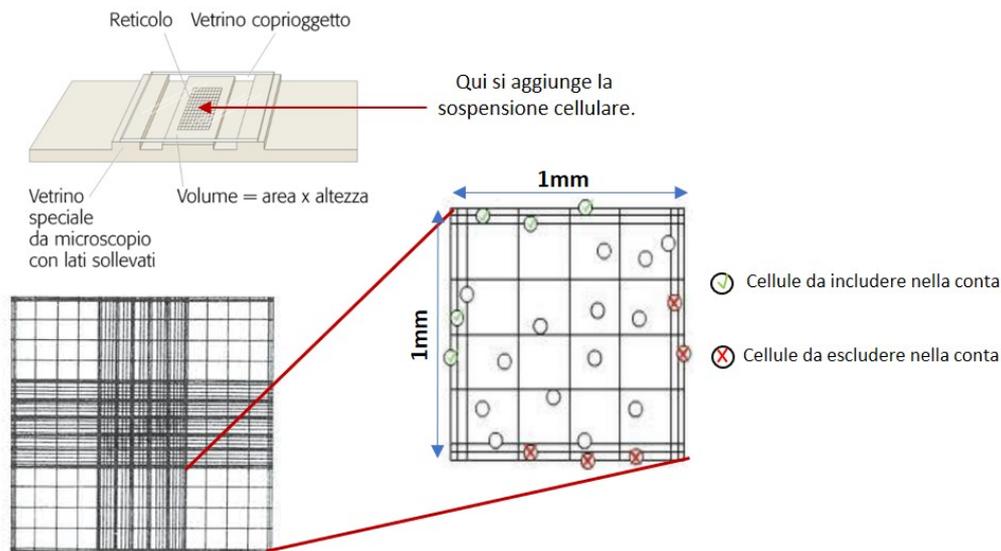


Figura 3.15: Camera di Burker.

3.3.3 Procedura di trattamento delle colture cellulari

Il requisito principale da osservare all'interno di un laboratorio in cui si effettua coltura cellulare è la necessità di mantenere un'area di lavoro asettica. Per questo motivo, i terreni, le soluzioni e gli strumenti che si utilizzano devono essere tutti sterili. Per ottenere condizioni di lavoro asettiche si opera sotto cappa biologica a flusso laminare verticale. Infatti, la cappa biologica serve a ridurre la contaminazione da particelle sospese nell'aria.

Prima e dopo l'utilizzo, la superficie di lavoro deve essere disinfettata con etanolo,

ordinata e attrezzata solo con gli strumenti necessari. Inoltre, ciascun strumento utilizzato deve essere disinfettato con etanolo prima di inserirlo all'interno della cappa.

In generale una coltura cellulare richiede:

- Una temperatura controllata (20-25°C);
- Un *pH* controllato (di solito è compreso tra 6.0 e 7.5);
- Una pressione osmotica controllata;
- Uno scambio adeguato di ossigeno e anidride carbonica;
- Fattori di crescita;
- Un substrato che fornisca alle cellule i nutrienti di cui hanno bisogno, tra cui amminoacidi, carboidrati, vitamine e minerali.

Il terreno di coltura presenta caratteristiche differenti che variano a seconda della linea cellulare da sviluppare.

Le cellule MRC-5 vengono coltivate in MEM contenente il 10 % di FBS (Fetal Bovin Serum) e l'1 % di una soluzione di Penicillina/Streptomicina. Le cellule vengono incubate a 37°C in atmosfera umidificata al 5 % di CO_2 . I principali passaggi da effettuare per il trattamento delle linee cellulari sono:

1. Si inseriscono 5 *ml* di terreno di coltura in una provetta. Questa operazione deve svolgersi sotto cappa biologica e tutti gli strumenti utilizzati devono essere disinfettati con etanolo prima di essere inseriti all'interno della cappa come descritto in precedenza.
2. Si scongela rapidamente (circa 2 minuti) il flaconcino contenente le cellule agitandolo delicatamente in un bagnetto a 37°C. Per ridurre la possibilità di contaminazione bisogna tenere il tappo del contenitore fuori dall'acqua.
3. Si rimuove il flaconcino dal bagnetto appena il contenuto è scongelato e si trasferisce il contenuto della fiaschetta all'interno della provetta contenente il terreno di coltura, operando sempre sotto cappa in condizioni asettiche.

4. Successivamente si centrifuga la sospensione cellulare a 1000 *rpm* per 8 minuti. In questo modo, il pellet cellulare si posa sul fondo, mentre il terreno contenete DMSO resta in sospensione.
5. Si rimuove rapidamente il sovrnatante dalla soluzione e si risospende il pellet cellulare in terreno fresco.
6. Successivamente si trasferiscono le cellule con il terreno di coltura in una fiasca T-75 all'interno della quale è contenuto altro terreno di coltura.
7. Alla fine, si inserisce la fiasca all'interno dell'incubatore a 37°C dove le cellule crescono fino ad occupare l'intera superficie disponibile. A confluenza, la crescita si arresta e le cellule devono essere trasferite in nuove fiasche.

La Figura 3.16 mostra schematicamente i passaggi descritti sopra.

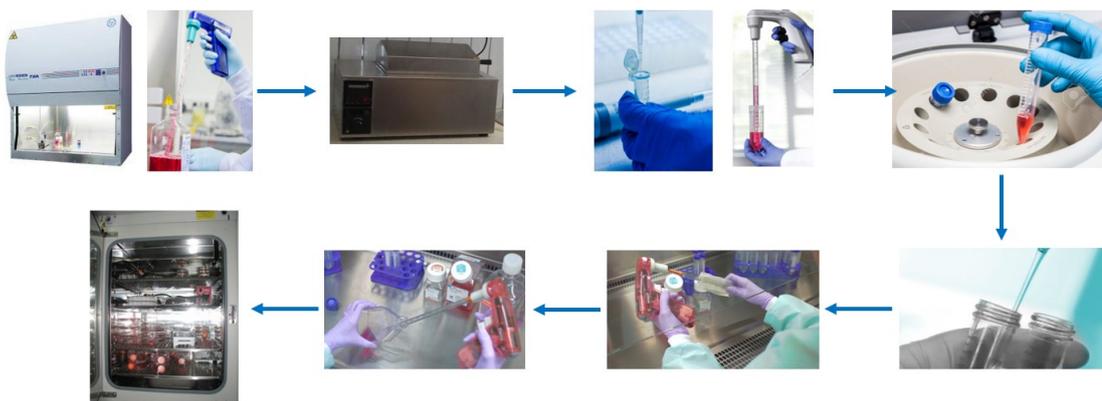


Figura 3.16: Procedura trattamento delle cellule.

3.3.4 Procedura di subcoltura

Ogni 2/3 giorni è necessario cambiare il terreno di coltura. I passaggi da eseguire, illustrati nella Figura 3.17, come nella procedura descritta precedentemente, devono essere svolti sotto cappa in condizioni asettiche e tutti i materiali e gli strumenti utilizzati devono essere disinfettati con etanolo.

1. Si aspira il terreno di coltura;

2. Si sciacqua lo strato cellulare con PBS e lo si aspira;
3. Si aggiungono 2 *ml* di tripsina all'interno della fiasca per staccare le cellule dalla superficie e la si posiziona all'interno dell'incubatore a 37°C per 3 minuti;
4. Si osservano le cellule al microscopio per controllare se la tripsina ha agito correttamente;
5. Infine, si inseriscono 5 *ml* di terreno di coltura all'interno della fiasca e la si inserisce nuovamente all'interno dell'incubatore.

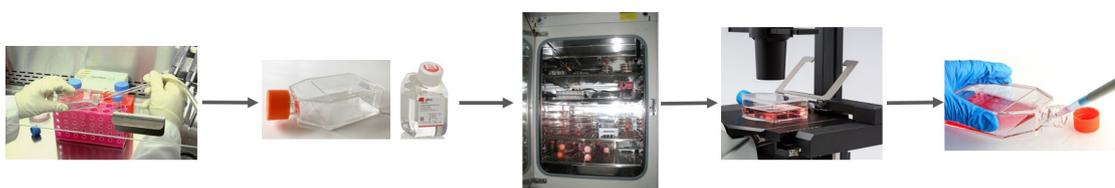


Figura 3.17: Rappresentazione schematica dei passaggi da effettuare per la subcoltura cellulare.

3.3.5 Cellularizzazione dell'idrogelo a base di collagene

Dopo aver preparato la soluzione di collagene e averla neutralizzata, come descritto precedentemente, la si posiziona sotto cappa biologica, attivando gli UV, per circa 30 minuti, lasciandola in agitazione sullo stirrer ad una temperatura <math><9^{\circ}\text{C}</math>.

1. Si raccolgono le cellule contenute all'interno del terreno di coltura, all'interno di una provetta.
Per sapere quante cellule si hanno a disposizione, si utilizza la camera di Burkner.
2. Si centrifugano le cellule, contenute all'interno del terreno di coltura, per 8 minuti a 1000 *rpm*. In questo modo, il pellet cellulare si posa sul fondo ed è possibile aspirare il terreno di coltura dalla provetta.
3. Si aggiungono 500 μl di terreno di coltura nelle cellule e si spipetta in modo da spaccare il pellet cellulare.

4. Successivamente si aggiunge il volume desiderato della soluzione di collagene all'interno delle cellule.
5. All'interno di una multiwell si aggiungono 130 μ l di soluzione di collagene contenente le cellule.
6. Si inserisce la multiwell all'interno dell'incubatore per 20 minuti.
7. Si aggiungono altri 200 μ l di terreno di coltura all'interno di ciascun pozzetto.
8. Alla fine, si posiziona la multiwell all'interno dell'incubatore per 48 ore.

3.3.6 Saggio di vitalità cellulare

Il LIVE/DEAD è un test fluorimetrico che consente di discriminare le cellule vive da quelle morte attraverso immagini in fluorescenza.

Questo metodo prevede l'utilizzo di due diversi coloranti: la calceina che si lega alle cellule vive colorandole in verde e l'etidio che interagisce con gli acidi nucleici delle cellule che presentano la membrana danneggiata, ovvero le cellule morte, colorando in rosso il loro nucleo.

1. In una eppendorf si aggiunge 1 *ml* di PBS, 0.5 μ l di calceina e 2 μ l di etidio.
2. Dopo aver aspirato il mezzo dai dischetti di gel contenenti le cellule, si spostano nei pozzetti di un'altra multiwell.
3. In ogni pozzetto si aggiungono 200 μ l di PBS per sciacquare i dischetti di gel e poi lo si aspira.
4. In ogni pozzetti si aggiungono 150 μ l della soluzione PBS, calceina ed etidio.
5. Si ricopre la multiwell con alluminio e la si lascia in agitazione sul piano basculante per 5 minuti e successivamente la si lascia fuori dall'incubatore per altri 20 minuti.
6. Infine, si posiziona la multiwell al di sotto del microscopio ottico per osservare le cellule vive e quelle morte.

3.4 Bioprinting idrogelo a base di collagene

3.4.1 Stampante

La stampante a disposizione presso il laboratorio Interdipartimentale del Politecnico di Torino, è la 3D Discovery della RegenHU, rappresentata in Figura 3.18.



Figura 3.18: Stampante 3D Discovery, RegenHU.

La stampante presenta 4 moduli di stampa:

1. Il primo modulo viene utilizzato per stampare idrogeli cellularizzati e permette di controllare sia la pressione ($110-1000\text{mPa.s}$) che la temperatura dell'estrusore (fino ad 80°C).
E' costituito da una micro testina di stampa compatibile con le cellule basata sulla tecnologia a getto elettromagnetico per un getto accurato o un'erogazione a contatto.
2. Il secondo modulo è un estrusore termopolimero tempo-pressione, utilizzato per stampare polimeri termoplastici ed è in grado di raggiungere pressioni

(50-200 000 $mPa.s$) e temperature molto più elevate del modulo precedente (fino ai 250°C).

3. Il terzo modulo viene utilizzato per stampare nanoparticelle core-shell. E' composto da una testina di stampa a due componenti basata su testine a getto d'inchiostro compatibili con le cellule.
4. Il braccio robotico viene utilizzato per stampare polimeri fotoreticolabili.

In particolare, per questo lavoro di tesi è stato utilizzato il modulo 1 evidenziato in Figura 3.19.



Figura 3.19: Modulo 1 per la stampa di idrogeli cellularizzati.

3.4.2 Realizzazione del modello

Per poter realizzare la stampa di un modello 3D con le caratteristiche desiderate, è necessario prima realizzare l'oggetto tramite l'utilizzo di un software CAD, scegliendo le varie dimensioni nel piano 3D.

Successivamente si settano i vari parametri che possono influire sulla stabilità e sull'aspetto dell'oggetto stampato, descritti di seguito:

- Altezza di ogni layer (mm): è lo spessore di ogni layer ed è il passo lungo l'asse z effettuato prima di estrarre un nuovo layer sopra il precedente. Lo spessore di ogni layer viene settato pari al 70-80 % del valore del diametro dell'ago.
- Densità di riempimento (*Fill Density*): è la quantità di filamento stampato all'interno dell'oggetto.

- Velocità di stampa (mm/s): si riferisce alla velocità con cui si muove l'estrusore mentre stende il filamento sul piatto.
- *Strand start delay*: è il tempo che intercorre da quando l'estrusore arriva sul piatto a quando comincia ad estrudere il filamento.

Tuttavia, prima di ottenere una struttura relativamente definita e stabile bisogna effettuare numerose prove in merito alla scelta dei parametri.

Conclusa questa operazione, si genera un *G-Code*, il linguaggio macchina che si interfaccia con il software della stampante 3D. Senza il *G-Code* la stampante non potrebbe interpretare ed eseguire le istruzioni date.

In questo studio, il software 3D utilizzato per realizzare il disegno CAD con le caratteristiche desiderate è il software BioCAD.

In Figura 3.20 è rappresentato il modello scelto: un quadrato di lato 12 mm , al cui interno vi è un secondo quadrato di lato 8 mm .

Successivamente, si sceglie il materiale del modello da stampare, in questo caso collagene, la velocità di stampa pari a 35 mm/s , lo spessore di ogni layers pari a 0.220 , poichè il diametro dell'ago utilizzato è di 250 mm , e lo *strand start delay* pari a 0 .

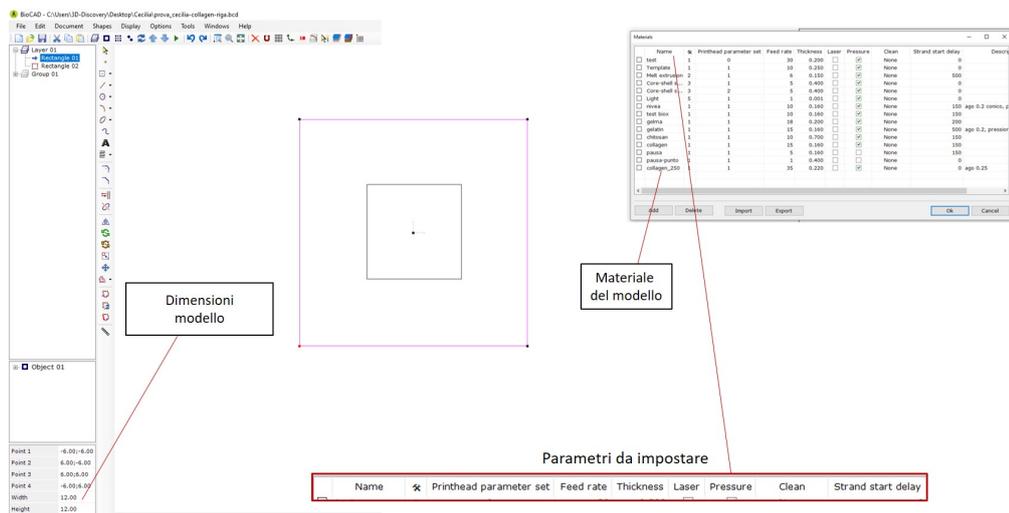


Figura 3.20: Disegno del modello CAD e impostazione dei parametri di stampa.

In Figura 3.21, si può osservare un'anteprima del modello da stampare nel piano tridimensionale.

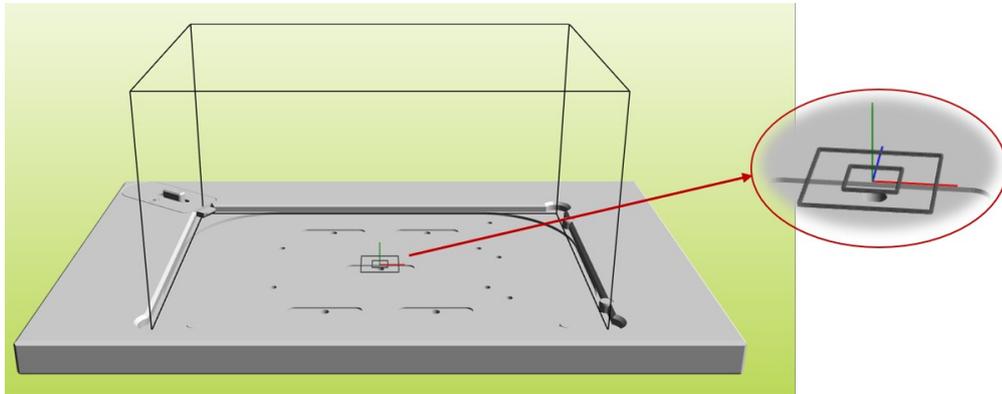


Figura 3.21: Anteprima del modello CAD.

Dopo aver settato i vari parametri di stampa, si genera il *G-Code*. Il *G-code* utilizzato è il discoveryHMI come si osserva in Figura 3.22.

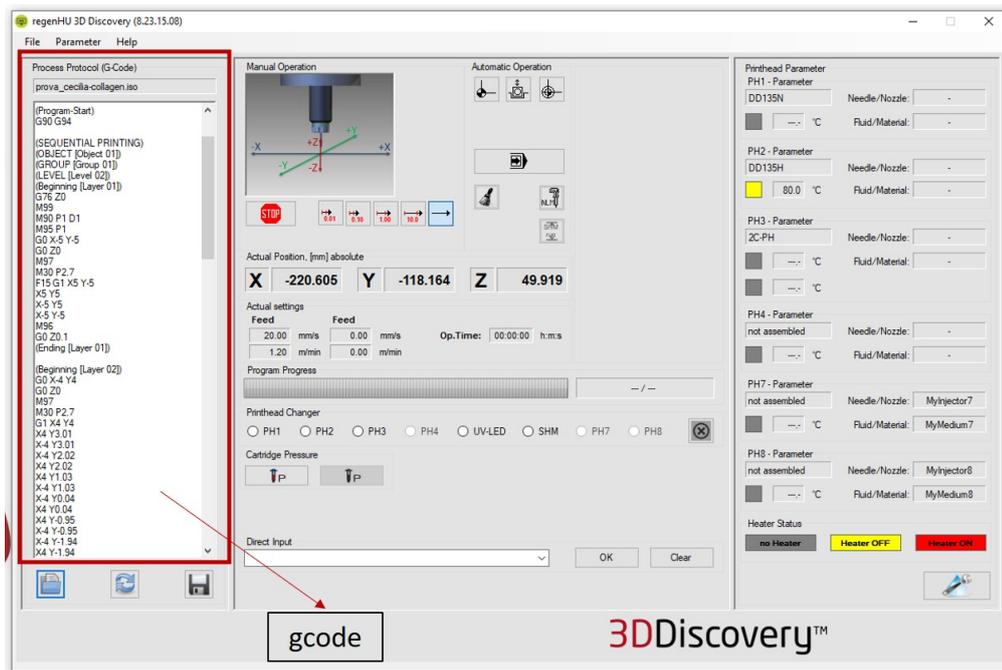


Figura 3.22: *G-Code* e software della stampante 3D.

Tramite il software della stampante 3D si calibra in modo automatico l'ago del

modulo utilizzato e l'altezza del piatto.

Invece, come si osserva dalla Figura 3.23, sia la pressione di erogazione del bioinchiostro, che la temperatura dell'alloggiamento contenente la siringa e del piatto sul quale viene estruso il materiale, si impostano manualmente.



Figura 3.23: Dispositivi per il controllo manuale dalla temperatura e della pressione di stampa.

Le variabili che influenzano maggiormente le caratteristiche e la processabilità del filamento estruso sono la pressione e la velocità di stampa. Infatti, per ottenere una struttura relativamente definita sono state effettuate numerose prove in merito alla scelta di questi due parametri, cercando di trovare un giusto compromesso tra le due.

Inizializzazione stampante

Il modulo 1 (Figura 3.24) è costituito in particolare da:

- Siringa, contenente il materiale da stampare.
- Ago, che può essere conico (adatto alla stampa di bioinchiostri cellularizzati) o cilindrico.
In questo lavoro è stato utilizzato un ago conico di diametro pari a 250 μ M.
- Alloggiamento della siringa.

- Piatto sul quale vengono posizionati i vetrini, mantenuti sotto vuoto per impedirne il movimento durante la stampa e sui quali verrà realizzato il modello 3D.

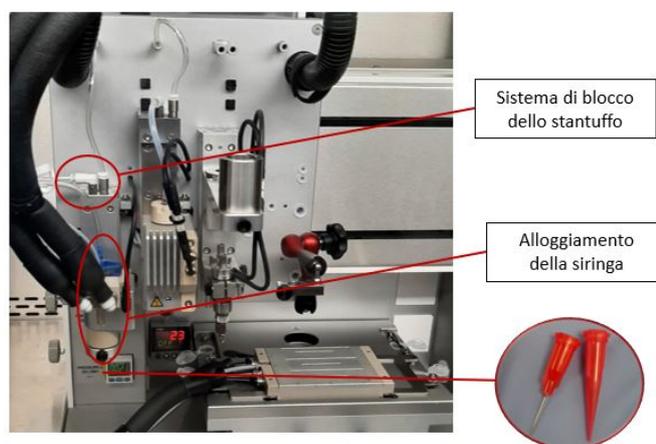


Figura 3.24: Modulo 1.

Prima di stampare il modello 3D, poichè la soluzione di collagene presentava molte bolle, come si osserva in Figura 3.25, è stata centrifugata a 3000 *rpm* per 5 minuti alla temperatura di 4°C, ottenendo una soluzione omogenea (Figura 3.26).



Figura 3.25: Soluzione di collagene prima della centrifugazione.



Figura 3.26: Soluzione di collagene dopo la centrifugazione.

Si impostano manualmente i valori desiderati di temperatura del piatto e dell'alloggiamento della siringa.

Non appena vengono raggiunti i valori di temperatura desiderati, si inserisce la siringa contenente la soluzione di collagene, in combinazione con l'ago, all'interno dell'apposito alloggiamento.

Successivamente, dallo schermo del PC si accede al programma CAD, si disegna il modello desiderato e si impostano i vari parametri di stampa.

In questo modo, viene generato il *G-Code* che permette di interfacciarsi con la stampante.

Prima di eseguire la stampa del modello, è necessario calibrare sia l'altezza dell'ago della siringa che quella del piatto.

L'asse z è l'asse lungo il quale si muove l'estrusore (siringa), mentre il piano x-y è rappresentato dal piatto. La calibrazione viene eseguita in modo automatico dalla stampante.

Conclusa l'inizializzazione della stampante si può eseguire il file contenente le istruzioni per la realizzazione del costrutto.

Il filamento generato viene quindi depositato sui vetrini posti sul piatto alla temperatura di 37°C in modo tale da permettere la transizione della soluzione di collagene dallo stato sol a quello gel. In questo studio, vengono implementati due diversi metodi di stampa.

Primo metodo di stampa

Nel primo metodo di stampa, sia la temperatura dell'alloggiamento della siringa, che del piattino vengono poste pari a 37°C. In questo modo, la transizione della soluzione di collagene avviene all'interno della siringa prima della stampa.

Secondo metodo di stampa

Nel secondo metodo di stampa, mentre, si utilizza una soluzione di collagene contenente riboflavina alla concentrazione 0.5 mM.

Inoltre, la temperatura della siringa è settata a 4°C e quella del piattino a 37°C. Per evitare la gelificazione del collagene, sia l'ago che la siringa contenente la soluzione, vengono posti all'interno del ghiaccio prima della stampa.

Capitolo 4

Risultati

4.1 *Swelling*

Le proprietà di rigonfiamento degli idrogeli sono dovute alla presenza dei gruppi idrofili all'interno del reticolo.

Le prove di *swelling* o rigonfiamento sono molto importanti in quanto, analizzando la percentuale d'acqua che viene assorbita dall'idrogelo durante il rigonfiamento, danno un feedback sul rilascio di farmaci.

Inoltre, le misurazioni del rapporto di rigonfiamento possono anche fornire informazioni sulla natura, il grado e la densità di reticolazione dell'idrogelo di collagene e possono essere utilizzate per ottenere indirettamente informazioni riguardo le proprietà meccaniche del gel come il modulo di Young [66].

Gli idrogeli di collagene sono costituiti da catene polimeriche idrofiliche. La porzione idrofila è la componente strutturale che maggiormente influenza le proprietà dell'idrogelo, in quanto sono responsabili delle interazioni con l'acqua e della successiva variazione di volume. In funzione della densità dei gruppi idrofili presenti sul polimero, l'assorbimento di acqua può aumentare anche di circa 1000 volte il peso del network rispetto a quello iniziale.

Dopo la transizione dallo stato sol a quello di gel, è stato misurato il peso di ciascun campione e in ognuno è stato aggiunto un volume di soluzione tampone

fosfato salino (PBS) pari ad 800 μ l.

I campioni sono stati pesati ad intervalli di 24 h e 72 h.

Lo *swelling* è stato calcolato tramite la seguente formula:

$$\frac{W_{gelF} - W_{gelI}}{W_{gelI}} \times 100 \quad (4.1)$$

Dove W_{gelI} rappresenta il peso del campione in fase gel al tempo zero, mentre W_{gelF} è il peso del campione ad un dato time step.

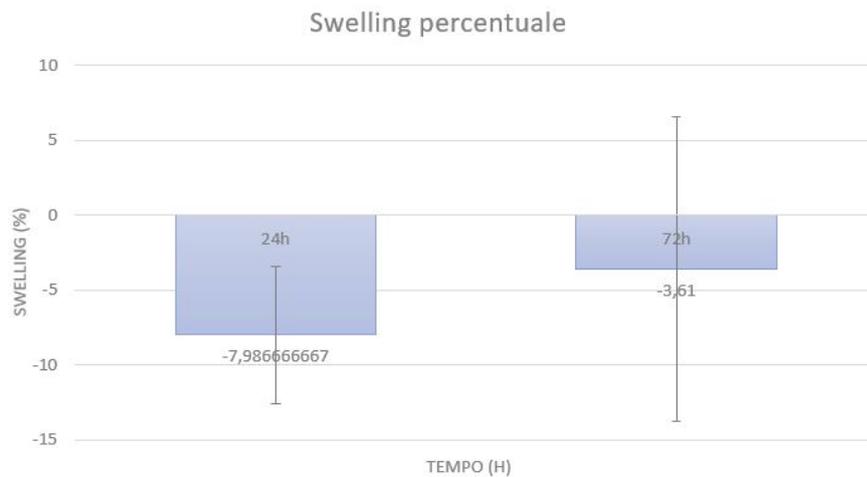


Figura 4.1: Grafico relativo allo *swelling* percentuale.

Dal grafico in Figura 4.1 si può notare che lo swelling risulta negativo, in quanto è maggiore il fenomeno di degradazione rispetto a quello di assorbimento di soluzione dall'ambiente circostante.

Questi risultati sono dovuti probabilmente all'utilizzo di una soluzione con ridotta concentrazione di collagene, che causa la formazione di una rete di fibre poco fitta e di conseguenza facilita l'ingresso di soluzione e la conseguente degradazione degli strati più superficiali del campione.

Infatti, il grado di reticolazione influenza l'area consentita per la diffusione attraverso la rete di idrogeli e quindi, la capacità degli idrogeli stessi di assorbire acqua. Gli idrogel costituiti da reti di polimeri idrofili reticolati, subiscono rigonfiamento anziché dissoluzione in acqua [67].

Durante l'acquisizione del peso a 72 h, uno dei tre campioni ha subito un rigonfiamento, da ciò risulta un valore percentuale di *swelling* positivo. Ciò contribuisce notevolmente all'aumento della deviazione standard come si può osservare dal grafico in Figura 4.1.

4.2 Esperimento di *turbidity*

Il processo di fibrillogenesi di collagene è stato monitorato misurando l'aumento della torbidità della soluzione di collagene mediante un lettore di micropiastre, a 310 nm.

E' stato impostato un incremento della temperatura, durante il test, da 0°C a 37°C, in modo tale da consentire la transizione della soluzione di collagene dallo stato sol a quello gel.

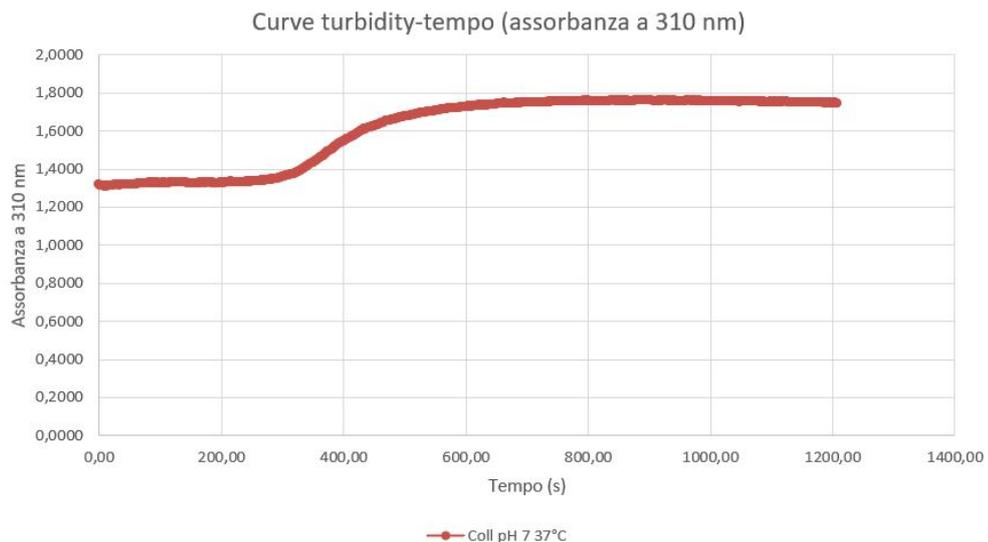


Figura 4.2: Curva turbidity-tempo della soluzione di collagene a pH 7 con assorbanza a 310 nm.

Come si osserva in Figura 4.2, la curva di torbidità della soluzione di collagene presenta un andamento di tipo sigmoidale, con tre fasi:

1. Una fase di nucleazione, senza un aumento rilevabile della torbidità, della durata di circa 4 minuti.

2. Una fase di crescita, in cui la torbidità aumenta rapidamente.
3. Una fase di plateau, in cui la torbidità rimane costante.

Questo è concorde con quanto riportato in letteratura [45].

La fase di nucleazione corrisponde alla formazione di intermedi, che variano da dimeri e trimeri a strutture costituite da 5 a 17 molecole impaccate lateralmente. Questi filamenti sono simili alle microfibrille che costituiscono l'unità base delle fibrille di collagene [39].

L'inizio della formazione di fibrille e della loro crescita assiale corrisponde all'inizio della fase esponenziale nella curva di torbidità. In questa fase, gli aggregati molecolari si autoassemblano ulteriormente in una rete di strutture filamentose per aggregazione laterale con un diametro di circa 4 *nm* e lunghe centinaia di *nm*, allineate in matrici parallele. La densità di impacchettamento di questi array quindi aumenta, generando fibrille compatte che tuttavia non mostrano ancora la periodicità del banding D [39].

Nella regione di plateau nella curva di torbidità, le fibrille sono completamente mature e hanno un diametro di circa 100-300 *nm*. I filamenti si allineano all'interno delle fibrille per formare le bande D di 67 *nm* caratteristiche del collagene di tipo I [39].

4.3 Spettro di emissione in fluorescenza

La Figura 4.3 mostra gli spettri di emissione in fluorescenza delle soluzioni di collagene a pH acido, ThT/collagene sia a pH acido che neutro e di ThT nel solo mezzo a pH neutro.

Per calcolare gli spettri di emissione, la lunghezza d'onda di eccitazione è stata impostata pari a 421 *nm*, mentre la lunghezza d'onda di emissione pari a 485 *nm*.

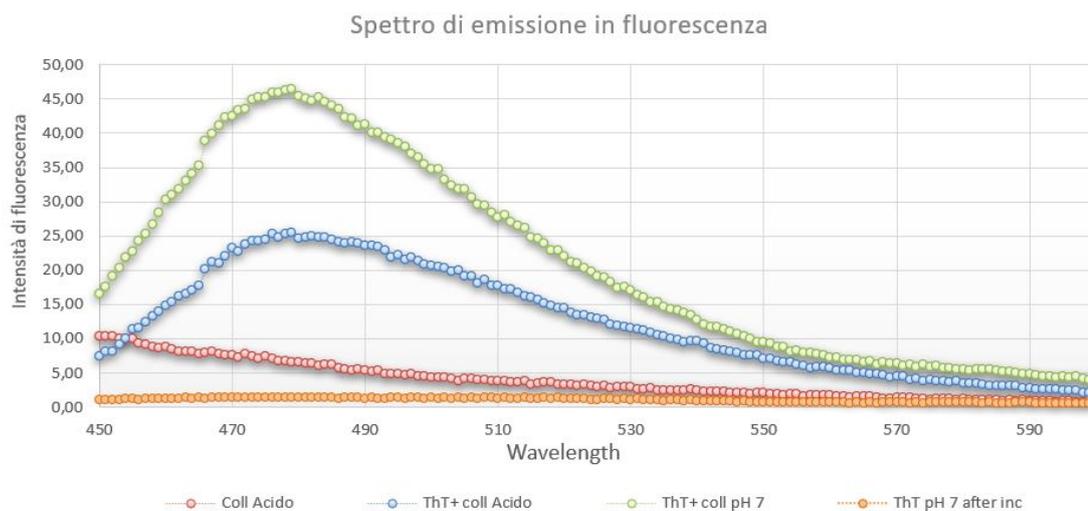


Figura 4.3: Spettri di emissione in fluorescenza delle soluzioni di collagene, ThT/collagene e ThT in DMEM e acido acetico, al variare del pH.

La soluzione di ThT/collagene a pH 7 ha mostrato una maggiore emissione in fluorescenza a 485 nm con eccitazione a 421 nm.

Infatti, Morimoto e i suoi collaboratori hanno dimostrato che ThT può legarsi specificamente alle fibrille di collagene, mostrando così una maggiore emissione di fluorescenza a 485 nm con eccitazione a 430 nm [68].

Non si osserva alcuna fluorescenza, mentre, delle soluzioni di ThT a pH 7 diluito in MEM e acido acetico e di collagene a pH acido. L'aumento dell'intensità di fluorescenza di ThT è proporzionale alla concentrazione di fibrille di collagene.

Il potenziamento specifico della fluorescenza mediante il legame ThT alle fibrille di collagene, quindi, è adatto per investigare le dinamiche di fibrillogenesi del collagene e la sua struttura.

4.4 Prove con il reometro

La reologia è un metodo appropriato per caratterizzare le proprietà meccaniche dell'idrogel a base di collagene poiché è rapido, sensibile, richiede campioni di piccole dimensioni e rivela differenze nell'architettura come il grado di reticolazione, l'omogeneità/eterogeneità strutturale e il peso molecolare [69].

I test effettuati con il reometro consentono di osservare in tempo reale la cinetica di reticolazione e le variazioni del modulo elastico G' e del modulo dissipativo G'' . Le prove con il reometro sono state svolte sia per i campione di soluzione a base di collagene a diverse concentrazioni (1 % e 1.5 %), sia per i campioni a base di collagene e riboflavina alle concentrazioni 0.5 mM.

I campioni di collagene contenenti riboflavina sono stati irradiati con luce UV dopo la transizione della soluzione dallo stato sol a quello gel. In questo modo, è possibile verificare sperimentalmente l'effetto della riboflavina sulle proprietà meccaniche e sul processo di fibrillogenesi del collagene. Di seguito sono rappresentati i risultati delle varie prove di *strain* e di *time*.

Il *time test* permette di monitorare la transizione dei campioni di collagene dallo stato sol a quello di gel.

Durante lo svolgersi della prova è stata impostato un incremento graduale della temperatura da 0°C a 37°C, in modo tale da consentire la transizione dell'idrogelo dallo stato sol a quello gel. La frequenza è stata mantenuta costante a 1 Hz e l'ampiezza dello sforzo è stata impostata pari all'1 %.

La transizione completa della soluzione dallo stato sol a quello gel si identifica nel grafico da un plateau del modulo G' .

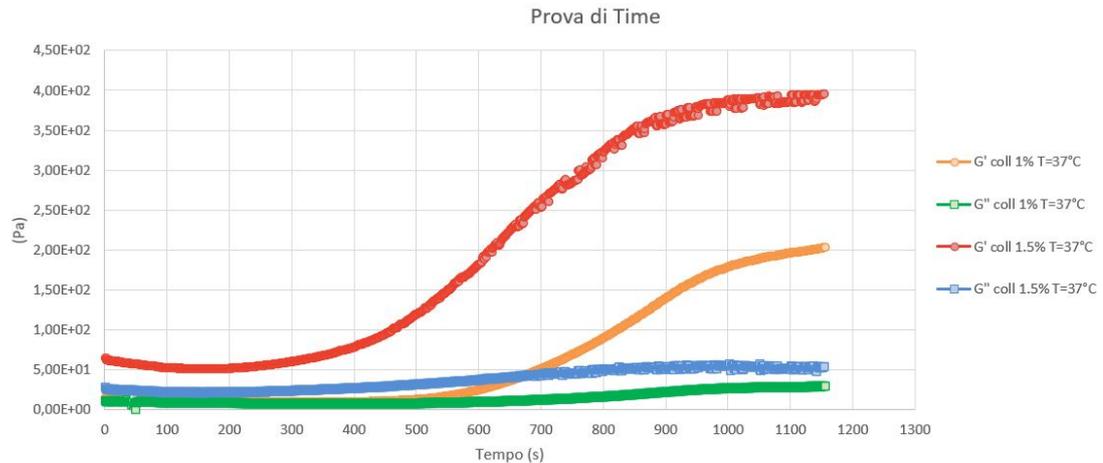


Figura 4.4: Grafico relativo alle prove di time dei campioni a diverse concentrazioni di collagene.

In Figura 4.4 sono riportate le curve dei moduli G' e G'' relative alla prova di time di due diverse soluzioni di collagene aventi concentrazione rispettivamente pari a 1 % w/v e 1.5 % w/v.

Una diminuzione della concentrazione di collagene modifica le proprietà strutturali e meccaniche del gel, rendendolo meno viscoso, rigido e deformabile. La formazione di una struttura più compatta, e di conseguenza di un gel più rigido è dimostrata anche dai valori del modulo elastico G' , il quale aumenta sensibilmente passando da una concentrazione di collagene 1 % w/v ad una concentrazione di 1.5 % w/v. Man mano che il gel comincia a formarsi, la viscosità dei campioni (relativa al modulo G'') cresce, così come il comportamento elastico (relativo al modulo G').

- Nel caso della soluzione di collagene all'1.5 % w/v il plateau nella curva G' comincia ad osservarsi dopo circa 17 minuti e il gel raggiunge la stabilità ad un valore di G'' pari a circa 4×10^2 Pa.
- Nel caso della soluzione di collagene all'1 % w/v, mentre, il plateau si osserva dopo circa 19 minuti e il gel raggiunge la stabilità ad un valore di G'' pari a circa 2×10^2 Pa.

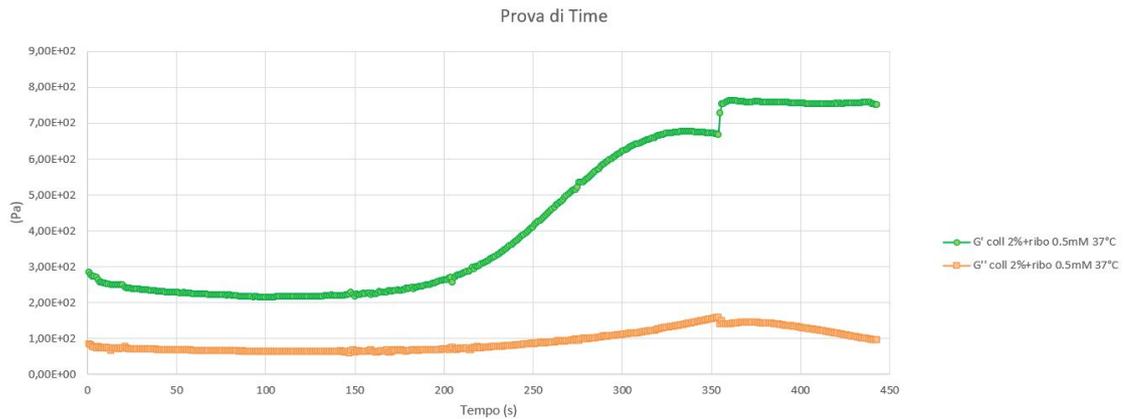


Figura 4.5: Valutazione dell'influenza della riboflavina sul processo di fibrillogenesi del collagene e sulle sue proprietà meccaniche. Grafico relativo alle prove di time dei campioni di collagene e riboflavina alla concentrazione di 0.5 *mM*.

Nella Figura 4.5 sono riportate le curve dei moduli G' e G'' ottenute dalla prova di time della soluzione di collagene contenente riboflavina 0.5 *mM*.

Nel momento in cui comincia ad osservarsi il plateau, i campioni contenenti riboflavina sono stati irradiati da luce UV. Questo ha comportato un aumento repentino del modulo G' e successivamente una fase di plateau finale, come si può osservare dalla curva verde in Figura 4.5.

Questi risultati sono conformi alla letteratura. Infatti, Diamantides e i suoi collaboratori [51], durante i test reologici dei bioink di collagene con reticolazione con riboflavina, hanno osservato 3 fasi:

1. una fase iniziale di plateau corrispondente ai 30 s prima dell'esposizione ai raggi UV;
2. una fase di crescita corrispondente ai 10 secondi durante l'esposizione ai raggi UV;
3. una fase finale di plateau corrispondente ai 30 s dopo l'esposizione agli UV.

Prima di essere esposti ai raggi UV, mentre, la presenza di riboflavina non ha influenzato il modulo G' del bioink di collagene.

Invece, campioni senza riboflavina non hanno sperimentato nessuna fase di crescita

dovuta all'esposizione ai raggi UV e i moduli sono rimasti costanti per tutta la durata della prova [51].

Lo *strain test* consiste nel verificare il limite LVE.

Questa prova viene eseguita sul gel completamente formato. Durante lo svolgimento del test, l'ampiezza dello sforzo aumenta gradualmente da 0.01 a 500%, mentre la frequenza è mantenuta a 1 Hz.

Come si osserva in Figura 4.6 si nota una ridotta capacità di deformazione dei campioni, infatti la regione viscoelastica lineare (LVE) si trova al di sotto dello 0.2 % di strain.

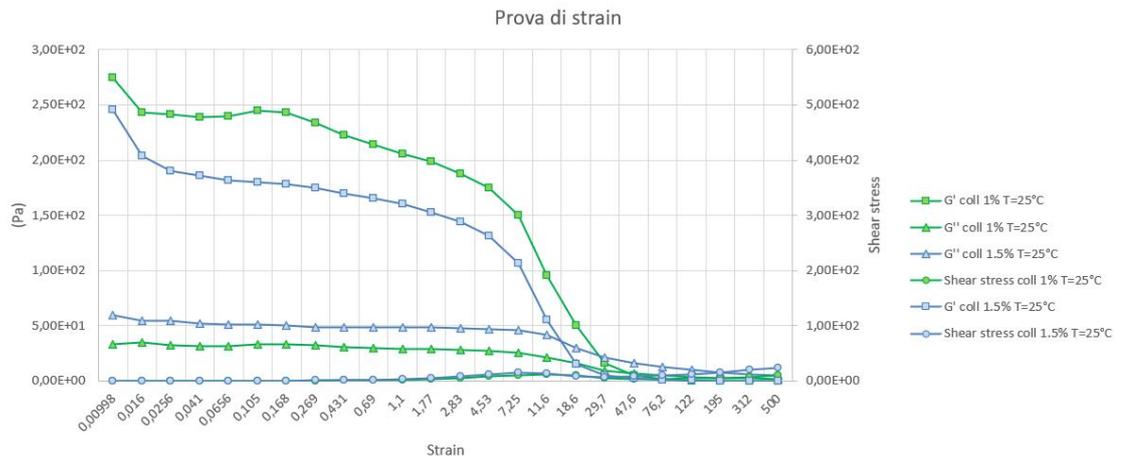


Figura 4.6: Grafico relativo alle prove di strain effettuate a 25°C sui campioni di collagene alle concentrazioni 1 % w/v e 1.5 % w/v.

Come si osserva dal grafico in Figura 4.7, la regione viscoelastica lineare della soluzione contenente riboflavina si trova al di sotto del 3 %.

Negli studi di Tirella e dei suoi collaboratori [48], la regione viscoelastica lineare della soluzione di collagene e riboflavina si trova al di sopra del 5 % di deformazione, ma le concentrazioni di collagene utilizzate era pari a 3 mg/ml e 5 mg/ml.

Questo si verifica, come detto precedentemente, a causa della diminuzione della concentrazione di collagene, che modifica le proprietà strutturali e meccaniche del gel, rendendolo meno viscoso, rigido e deformabile.

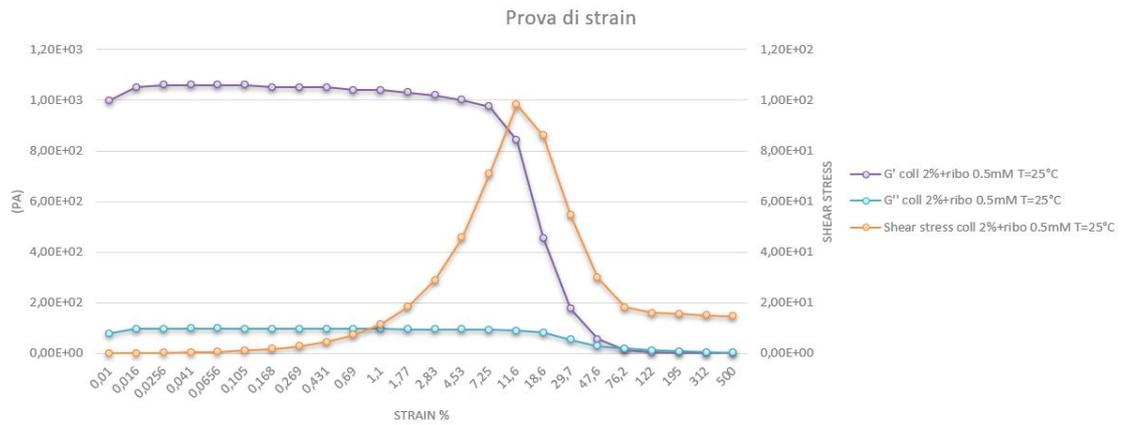


Figura 4.7: Grafico relativo alle prove di strain, effettuate alla temperatura ambiente, sui campione di collagene e riboflavina 0.5 *mM*.

Nella regione viscoelastica lineare (LVE), la dipendenza dalla frequenza dei moduli G' e G'' può essere utilizzata per dedurre aspetti importanti della struttura del gel e del suo comportamento meccanico. Durante la prova di *frequency* viene mantenuto costante il valore della deformazione (ampiezza pari all'1 %), mentre viene gradualmente variata la frequenza in un range definito dal limite di linearità (0.1 - 100 *rad/s*) e la temperatura che aumenta gradualmente da 0°C a 37°C. Come si osserva in Figura 4.8 , il modulo di elasticità G' è sempre maggiore del modulo di perdita G'' , il campione quindi è nello stato di gel.

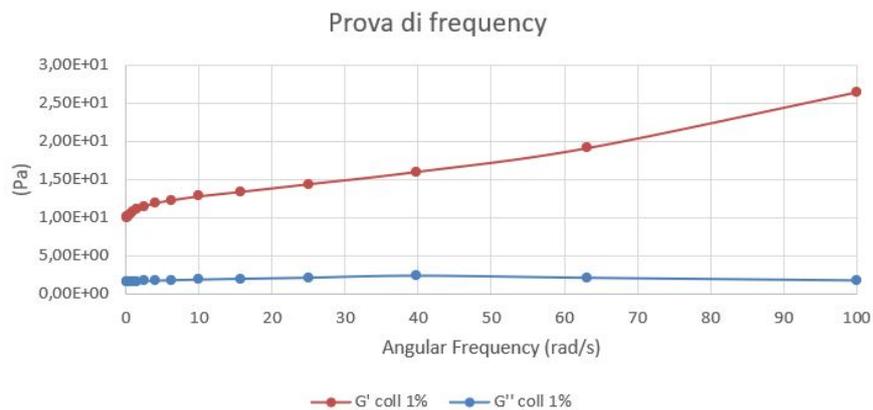


Figura 4.8: Grafico relativo alla prova di frequency effettuata sul campione con concentrazione di collagene pari all'1 % w/v.

4.5 3D Bioprinting

Le prove di stampa effettuate con il primo metodo sono state realizzate mantenendo sia l'alloggiamento della siringa che il piattino ad una temperatura di 37 °C, mentre per il secondo metodo di stampa, la temperatura della siringa è stata mantenuta ad una temperatura inferiore a 4°C e quella del piattino a 37°C.

Per effettuare una prova preliminare di stampa, è stata scelta una geometria semplice, costituita da un quadrato 12x12 mm al cui interno vi era un secondo quadrato 8x8 mm.

4.5.1 Primo metodo di stampa

Come si può osservare dalla Figura 4.9, i layer depositati durante la stampa risultano discontinui, poichè la soluzione all'interno della siringa non risulta omogenea. Inoltre, essendo la soluzione molto viscosa spesso si verificava l'occlusione dell'ago. Infine, le strutture stampate risultano molto instabili in quanto tendono a perdere il loro contenuto di acqua molto velocemente e di conseguenza non mantengono la struttura e non consentono la deposizione di più strati.

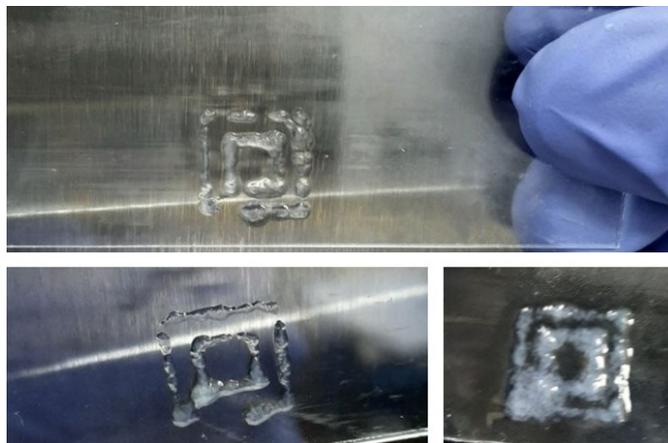


Figura 4.9: Modelli 3D ottenuti con il primo metodo di stampa.

Per cercare di risolvere le problematiche riscontrate è stata aumentata la velocità di estrusione da 15 mm/s a 35 mm/s. Nonostante ciò, l'ago continuava ad occludersi e i filamenti stampati erano discontinui, inoltre, spesso è stata riscontrata

un'eccessiva deposizione di materiale nello schema della struttura stampata.

4.5.2 Secondo metodo di stampa

Nel secondo metodo di stampa è stata utilizzata una soluzione di collagene contenente una concentrazione 0.5 mM di riboflavina. L'aggiunta della riboflavina alla soluzione migliora le proprietà meccaniche del collagene come è stato dimostrato nelle prove reologiche effettuate e descritte precedentemente (paragrafo 4.4).

A differenza del primo metodo di stampa, la temperatura dell'alloggiamento della siringa è stata impostata pari a 4°C per evitare la transizione allo stato gel della soluzione. L'abbassamento della temperatura permette di evitare l'occlusione dell'ugello durante l'estrusione del materiale dal momento che quest'ultimo si trova allo stato sol e presenta una viscosità minore. Inoltre, ciò permette di ottenere la stampa di filamenti continui sulla superficie dei vetrini.

Dal momento, prima della stampa, l'ago fuoriesce dall'alloggiamento della siringa, è stato posizionato all'interno di ghiaccio. Ciò con lo scopo di evitare la reticolazione della soluzione contenuta nell'ago stesso durante la stampa e quindi l'occlusione di quest'ultimo.

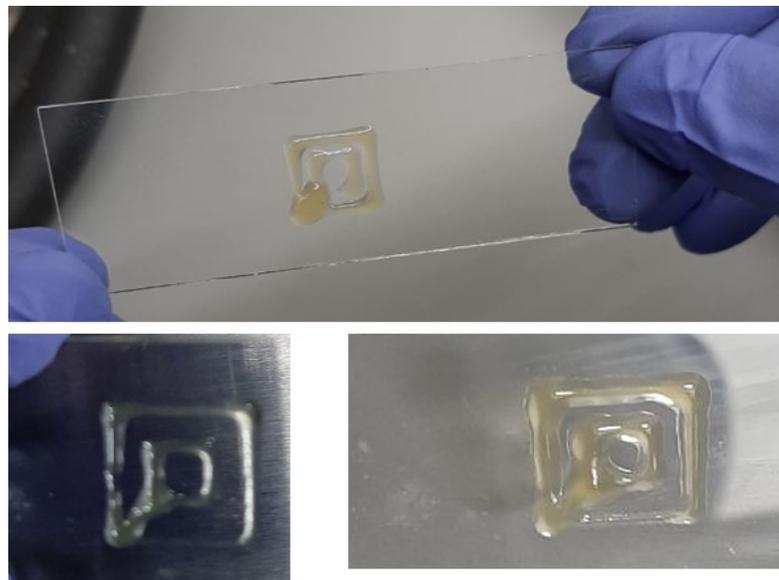


Figura 4.10: Modelli 3D stampati con il secondo metodo di stampa.

Come si osserva dalla Figura 4.10, la riboflavina consente la stampa di strutture più stabili, mostrando quindi un miglioramento delle proprietà di stampaggio del collagene. Osservando l'immagine, lo strato depositato risulta essere un singolo layer continuo, rispetto al caso precedente in cui era depositato in modo discontinuo. Dopo numerose prove, è stato trovato un giusto compromesso tra la velocità di stampa, impostata a 35 mm/s , e la pressione, scelta pari a 25 KPa . Questo ha permesso la deposizione di filamenti più sottili e la stampa di strutture più definite.

4.6 Vitalità cellulare

In questo studio è stata osservata l'adesione e la proliferazione dei fibroblasti derivati dallo stroma della parete alveolo-capillare sugli idrogeli di collagene mediante saggio di vitalità cellulare LIVE/DEAD.

In questo metodo, la calceina si lega alle cellule vive colorandole in verde, mentre l'etidio interagisce con gli acidi nucleici delle cellule che presentano la membrana danneggiata, ovvero le cellule morte, colorando in rosso il loro nucleo.

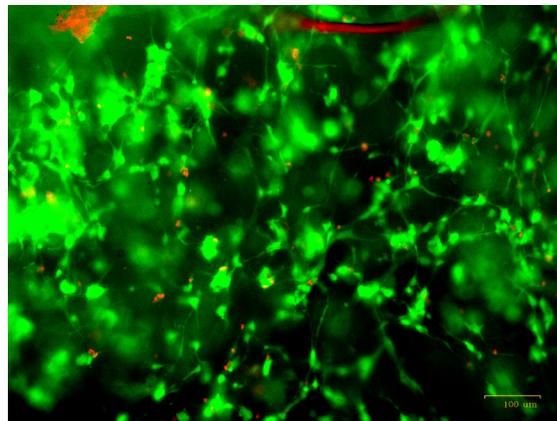


Figura 4.11: Vitalità della linea cellulare MRC-5 all'interno dell'idrogelo di collagene dopo 48 h .

I fibroblasti sono stati coltivati all'interno dell'idrogelo per 48 h e 72 h e l'adesione e la proliferazione cellulare è mostrata nelle Figure 4.11 e 4.12.

In questo test di biocompatibilità preliminare, le cellule vive (verde) sono cresciute

significativamente più delle cellule morte (rosso), il che indica un'eccellente vitalità cellulare e biocompatibilità dell'idrogelo di collagene.

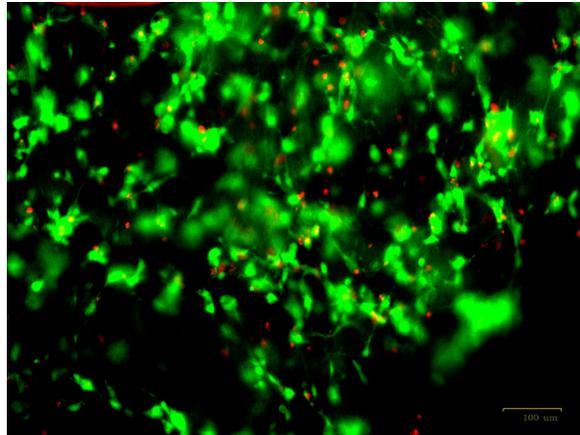


Figura 4.12: Vitalità della linea cellulare MRC-5 all'interno dell'idrogelo di collagene dopo 72 *h*.

Capitolo 5

Conclusioni e sviluppi futuri

5.1 Conclusioni

L'obiettivo di sviluppare un modello di polmone realistico e biomimetico risulta essere notevolmente importante dal momento che ciò permetterebbe di comprendere e trattare adeguatamente le patologie polmonari, oltre che valutare l'efficienza e la tossicità dei farmaci.

La validazione dei farmaci avviene tuttora tramite l'utilizzo di modelli animali. Oltre alle limitazioni derivanti dal problema etico correlato a questa pratica, l'utilizzo di tali modelli presenta ulteriori criticità. Infatti, sono ad essi associati costi elevati e lunghi periodi di sviluppo e risposta a seguito di test di attività farmacologica. La differenza, talvolta notevole, tra le strutture anatomiche animali e quelle umane comporta una dilatazione dei tempi non trascurabile.

Per ottenere un modello in vitro che possa replicare le funzioni biologiche e le proprietà meccaniche dei tessuti ed organi umani è importante focalizzarsi sull'ottenimento di alcune proprietà. In primis le proprietà fisiche, chimiche e biologiche del tessuto da sviluppare, devono essere congruenti a quelle del tessuto da replicare. Uno degli approcci più promettenti è quello della tecnica di bioprinting 3D. Questa metodologia di sviluppo presenta alcuni vantaggi rispetto ai metodi utilizzati tradizionalmente. Tra questi vi è la possibilità di co-stampare materiale e cellule in forma multistrato per creare costrutti con specifiche proprietà biochimiche, biomeccaniche

e fisiologiche.

Come ampiamente discusso nel Capitolo 1, il materiale depositato durante la stampa, il bioink, deve possedere adeguate proprietà reologiche, meccaniche e biologiche per ottenere dei risultati ottimali. Infatti, da queste proprietà dipendono la stampabilità, la fedeltà di forma, la risoluzione strutturale e la funzionalità dei tessuti e degli organi stampati.

Nel presente lavoro di tesi, per indagare i vantaggi della tecnica, è stato utilizzato un idrogelo a base di collagene di tipo I, essendo la proteina più abbondante del tessuto polmonare, oltre ad essere biocompatibile e biodegradabile. Inoltre, consente ai tessuti di resistere alle deformazioni e allo stress ripetitivo.

Come è stato dimostrato in vari studi presenti in letteratura, la concentrazione, la viscosità e la densità di reticolazione dell'idrogelo di collagene influenzano la stampabilità e l'attività biologica delle cellule incapsulate in esso.

Per questo motivo, è stata svolta una completa caratterizzazione delle proprietà meccaniche e fisiche dell'idrogelo a base di collagene, ed è stato dimostrato il suo possibile utilizzo per la realizzazione di costrutti cellularizzati, attraverso test reologici, di torbidità, di fluorescenza, di swelling e di citocompatibilità (LIVE/DEAD).

Come descritto da Zou et. al [45], la cinetica del processo di fibrillogenesi del collagene è comunemente monitorata mediante la misurazione della torbidità basata sulla trasmissione della luce in funzione del tempo.

Nei risultati mostrati nel Capitolo 4, la curva di torbidità ottenuta durante gli esperimenti effettuati ha confermato che la fibrillogenesi del collagene è un processo a più stadi, che comprende una fase di nucleazione, una fase di crescita assiale e una fase di crescita laterale in accordo con quanto riportato nello studio [45].

Gli esperimenti sullo spettro di emissione in fluorescenza riprodotti hanno confermato che il potenziamento della fluorescenza mediante il legame ThT alle fibrille di collagene è adatto per investigare le dinamiche di fibrillogenesi del collagene e la sua struttura. Infatti, come riferito da Morimoto e i suoi collaboratori [68], la ThT può legarsi specificamente alle fibrille di collagene, mostrando così una maggiore

emissione di fluorescenza a 485 nm con eccitazione a 430 nm.

Dai risultati dei test reologici, Figura 4.4, è possibile concludere che una diminuzione della concentrazione di collagene modifica le proprietà strutturali e meccaniche del gel, rendendolo meno viscoso, rigido e deformabile. La formazione di una struttura più compatta, e di conseguenza di un gel più rigido e stabile è dimostrata anche dai valori del modulo elastico G' , il quale aumenta sensibilmente passando da una concentrazione di collagene 1 % w/v ad una concentrazione di 1.5 % w/v.

I costrutti 3D realizzati con idrogeli cellularizzati dovrebbero possedere le seguenti caratteristiche:

- Adeguata stabilità meccanica;
- Biocompatibilità e capacità di promuovere la migrazione, la crescita e la differenziazione cellulare;
- Dimensioni clinicamente rilevanti ed elevata accuratezza.

Per quanto riguarda il primo punto, il collagene puro utilizzato come bioinchiostro presenta delle limitazioni nella stampa di strutture stabili, dovute alle scarse proprietà meccaniche. Per questo motivo si è sfruttato il processo di crosslinking del collagene con la riboflavina, per migliorare le sue proprietà di stampa sulla base dello studio [51].

Dai risultati dei test reologici effettuati, Figura 4.5, si può osservare come le proprietà fisiche e meccaniche dell'idrogelo di collagene siano migliorate utilizzando la riboflavina. L'aggiunta e l'attivazione della riboflavina nella soluzione di collagene ha determinato la generazione di legami incrociati che permettono di rinforzare i costrutti di collagene e gli consentono di avere un valore significativamente più alto del modulo elastico.

È stato dimostrato, quindi, che la riboflavina rende il collagene più stabile e resistente alle deformazioni, in accordo a quanto presente in letteratura [51].

Il processo di reticolazione, inoltre, permetterebbe di realizzare strutture multi-strato. I primi campioni ottenuti con questo metodo hanno dimostrato di essere

relativamente più stabili rispetto ai campioni ottenuti con il solo collagene. Tuttavia, nonostante la soluzione di collagene fosse stata centrifugata prima della stampa per la presenza di numerose microbolle d'aria che si sono formate durante il processo di realizzazione della soluzione, si è spesso verificato l'intasamento dell'ugello durante l'estrusione del filamento. Probabilmente, nonostante la centrifugazione, la presenza di microbolle d'aria non è stata completamente eliminata. Una possibile soluzione a questo problema potrebbe essere quella di utilizzare un'apposita strumentazione che permetta di eliminare le bolle all'interno della soluzione.

Infine, sono stati svolti test preliminari di coltura cellulare con fibroblasti derivati dallo stroma della parete alveolo-capillare, che hanno dimostrato la biocompatibilità dell'idrogelo di collagene prodotto e la sua applicabilità per la realizzazione di modelli *in vitro*. Tuttavia, dovranno essere fatti nuovi test per confermare e quantificare la vitalità delle cellule all'interno dell'idrogelo di collagene.

5.2 Sviluppi futuri

5.2.1 Approccio di stampa

A partire dai risultati di stampa ottenuti, un lavoro futuro prevede l'ottimizzazione del metodo e dei parametri di stampa e la realizzazione di modelli 3D maggiormente complessi, stabilendo in tal modo il protocollo di stampa ottimale.

Inoltre, ciò permetterebbe di confermare i vantaggi dell'utilizzo di idrogeli di collagene per la stampa di un robusto costrutto 3D, realizzato con lo scopo di indagare e trattare adeguatamente le patologie polmonari e per valutare l'efficienza e la tossicità dei farmaci.

Dopo aver dimostrato che la stampabilità del collagene dipende dalle sue proprietà reologiche e che queste possono essere migliorate con l'aggiunta di riboflavina all'interno della soluzione, per la realizzazione di un modello multistrato, in futuro si potrebbe stampare e reticolare strato per strato il materiale con la luce UV.

Infatti, l'attivazione della reticolazione della riboflavina con la luce UV alla fine di ogni layer estruso, potrebbe migliorare la stampabilità e permetterebbe la

deposizione di più layer sovrapposti, come è stato dimostrato da Diamantides e i suoi collaboratori [51].

5.2.2 Cellularizzazione del bioinchiostro

Infine, un altro sviluppo interessante è quello che prevede di incapsulare fibroblasti di polmone all'interno dell'idrogel di collagene, formando il bioink e permettendo la realizzazione di una struttura 3D cellularizzata. Le cellule potranno proliferare all'interno della struttura *in vitro* fornendo costrutti di tessuto biologico utilizzabili per valutare l'efficienza dei farmaci, per test preclinici e per impianti.

Per far ciò sarà necessario valutare diversi fattori che possono influenzare la vitalità cellulare, come la larghezza dell'ago e la pressione applicata alle cellule durante la stampa. Inoltre, è necessario, trovare un giusto compromesso tra concentrazione di collagene che ottimizzi la proliferazione cellulare e allo stesso tempo permetta la realizzazione di strutture 3D stabili. Infatti, dalla concentrazione di collagene dipende la sua viscosità.

La deformazione e il collasso delle strutture si verificano con materiali a bassa viscosità, quindi maggiore sarà la concentrazione di collagene e di conseguenza maggiore sarà anche la viscosità della soluzione e, di conseguenza, la stabilità della struttura stampata nonostante resti il problema del frequente intasamento dell'ugello, che si verifica con bioinchiostri altamente viscosi.

Inoltre, un'elevata concentrazione di collagene influisce direttamente sulla vitalità cellulare, poichè la migrazione e la proliferazione cellulare sono inibite a causa dell'intreccio delle catene polimeriche.

Diamantides e i suoi collaboratori [70] hanno effettuato esperimenti sui bioinchiostri di collagene, in modo tale da ottenere informazioni circa gli effetti scaturiti, a seguito dell'incorporazione di cellule, sulla reologia e sulla stampabilità dei bioinchiostri stessi.

Durante lo studio sono stati utilizzati condrociti primari, a densità pari da ottenere caratteristiche rilevanti per l'ingegneria del tessuto cartilagineo, incorporati in bioinchiostri di collagene con concentrazione di 8 *mg/ml*.

I costrutti stampati sono stati coltivati fino a 14 giorni per valutare il comportamento delle cellule a lungo termine.

Inizialmente ci si è posti l'obiettivo di determinare come l'aggiunta di densità cellulari, fino a 100 milioni di cellule/ml, possa influire sulle proprietà reologiche e sulla stampabilità del bioinchiostro. Per poter verificare l'effettiva variazione delle proprietà, quest'ultime, sono state valutate prima, durante e dopo la gelificazione. Successivamente, si è deciso di approfondire l'influenza esercitata dal processo di bioprinting sulla vitalità cellulare e sulla funzione dei condrociti incapsulati all'interno del bioinchiostro.

Il collagene di tipo I, utilizzato in questo studio, è stato estratto dai tendini di coda di ratto, ottenendo una concentrazione finale di collagene pari a 8 mg/ml e una densità cellulare finale pari a $0, 5 \times 10^6, 10 \times 10^6, 25 \times 10^6$ e 100×10^6 cellule/ml. Uno degli strumenti utilizzati per determinare le proprietà reologiche del bioinchiostro di collagene è il reometro Anton-Paar MCR 501. Questo strumento è stato utilizzato impostando una frequenza di $0,1 \text{ Hz}$ e una deformazione dello $0,5 \%$. Per prevenire la disidratazione, i bioink di collagene sono stati caricati sul reometro con olio minerale. Tramite un esperimento di time test (Figura 5.1), sono state ottenute misurazioni del modulo di conservazione (G') e il modulo di perdita (G''), in particolare l'esperimento è stato eseguito per 5 minuti a 4°C seguiti da 30 minuti a 37°C .

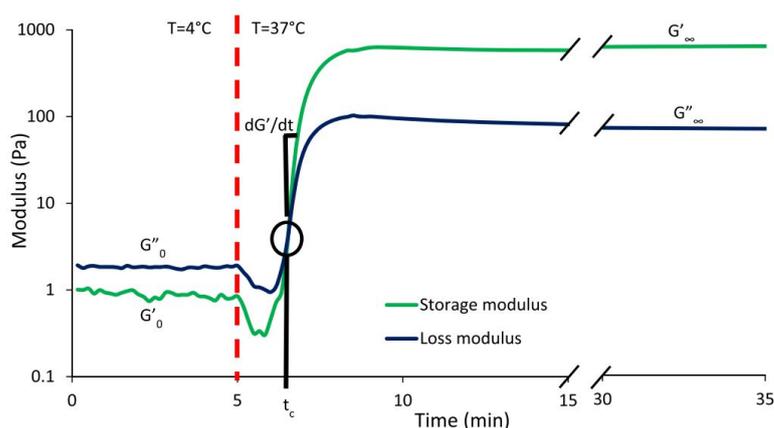


Figura 5.1: Risultati rappresentativi dei test reologici di bioinchiostri di collagene da 8 mg/ml [70].

Come si osserva in Figura 5.2, dai risultati ottenuti è stato dimostrato che l'aggiunta di cellule permette di ottenere un aumento del modulo elastico G' e della viscosità del collagene prima della gelificazione. Mentre si è osservato un comportamento diverso all'aumentare della densità cellulare, che ha comportato una diminuzione del modulo elastico nella fase di gel e della velocità di gelificazione. La riduzione della velocità di gelificazione potrebbe essere dovuta al fatto che le cellule bloccano fisicamente i siti di legame necessari per l'autoassemblaggio della fibra di collagene ritardando in tal modo il processo. Inoltre, è stato riscontrato che la densità cellulare ha una scarsa influenza sulla variazione del tempo di crossover.

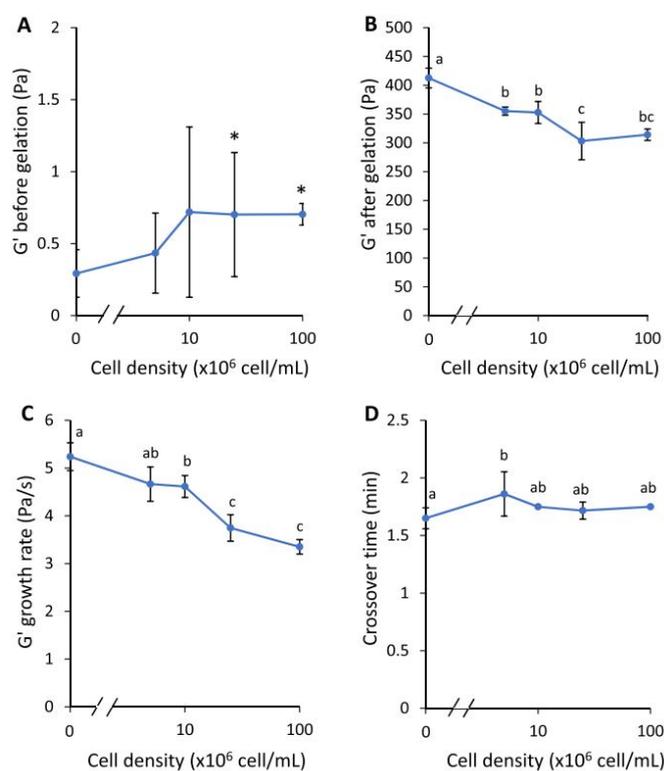


Figura 5.2: Proprietà reologiche dei bioink di collagene prima, durante e dopo la gelificazione indotta dalla temperatura con densità cellulari di 0, 5, 10, 25 e 100 milioni di cellule/ml. (A) G' del bioink a 4 ° C prima della gelificazione. (B) G' del bioink dopo completa gelificazione a 37 ° C. (C) Tasso di crescita massimo di G' dopo che la temperatura è stata aumentata a 37 ° C. (D) Tempo di crossover di G' dopo che la temperatura è stata aumentata a 37 ° C [70].

Per effettuare il processo di stampa del bioinchiostro, la soluzione è stata posta all'interno di una siringa da 10 ml che è stata successivamente posta a contatto con impacchi di ghiaccio, durante tutto il processo di stampa, per prevenire la gelificazione precoce del collagene. Il processo di stampa è avvenuto tramite l'utilizzo di un ugello conico con un diametro pari a 0,25 mm. Inoltre, durante il processo si è mantenuta la temperatura del vetrino ad un valore di 37°C.

Dai test di stampabilità effettuati è possibile osservare come l'utilizzo di densità cellulari maggiori (25 e 100 milioni di cellule/ml) permetta di ottenere una migliore stampabilità. Inoltre, l'aumento delle densità cellulari ha permesso di ottenere una migliore risoluzione di stampa. I bioinchiostri di collagene con densità cellulari di 5, 25 e 100 milioni di cellule/ml hanno prodotto linee stampate con larghezze significativamente inferiori rispetto a quelle stampate con bioinchiostri acellulari. Le linee stampate con bioinchiostri acellulari hanno mostrato larghezze di circa 1,2 mm mentre le linee stampate con bioinchiostri contenenti 100 milioni di cellule/ml risultano essere con larghezze di circa 0,8 mm, ottenendo in tal modo un miglioramento del 33 % nella risoluzione di stampa.

Sono stati eseguiti test di citocompatibilità attraverso il kit LIVE/DEAD per determinare la vitalità dei condrociti immediatamente dopo la stampa e fino a 14 giorni in coltura. Per questi test, tutti i costrutti biostampati sono stati fabbricati utilizzando bioinchiostri al collagene contenenti 10 milioni di cellule/ml. La vitalità è risultata essere elevata, circa > 90 % al giorno 0 ed inoltre è rimasta elevata anche durante i 14 giorni trascorsi in coltura, come si osserva in Figura 5.3. Da ciò è possibile affermare che le sollecitazioni di taglio applicate alle cellule durante il processo di bioprinting non hanno mostrato un valore così elevato tale da causare la morte cellulare.

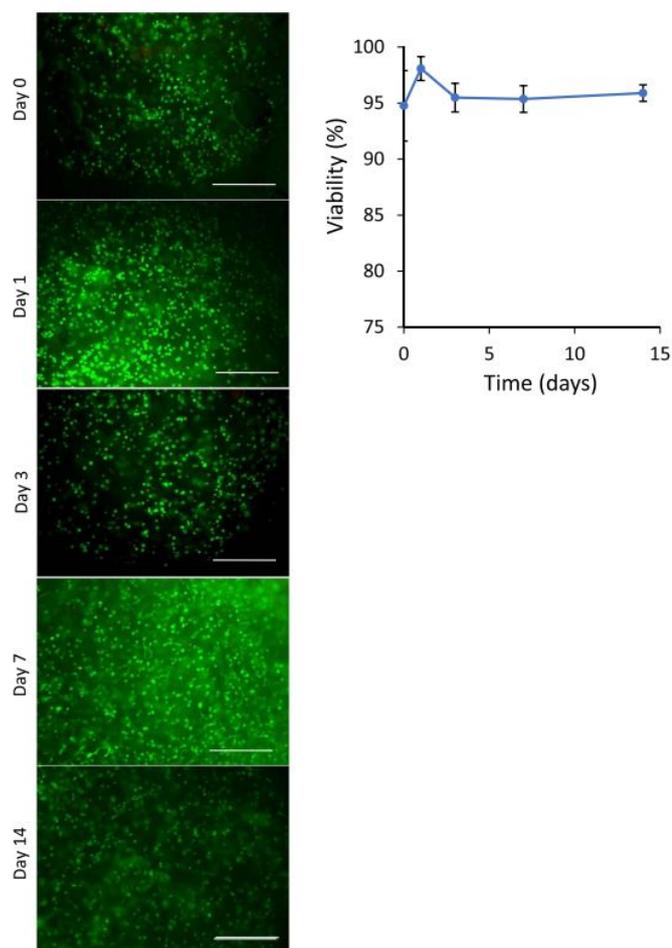


Figura 5.3: Vitalità dei condrociti nei costrutti biostampati di collagene dopo la biostampa. Tutti i campioni sono stati fabbricati utilizzando bioinchiostri al collagene con 10 milioni di cellule/ml [70].

Lo stesso Diamantides [51] ha dimostrato anche gli effetti della reticolazione della riboflavina sulla vitalità cellulare dei condrociti bovini.

In questo studio, la riboflavina aveva una concentrazione finale pari a 0,5 mM, mentre il collagene una concentrazione finale di 4, 8 o 12 mg.

I condrociti incorporati nell'idrogel di collagene senza reticolazione della riboflavina attivata dalla luce blu sono rimasti altamente vitali dopo 20-24 ore. La vitalità cellulare è rimasta elevata (>95%) a tutte le concentrazioni di collagene testate. Tuttavia, a seguito della reticolazione ottenuta tramite riboflavina attivata

dalla luce blu si è verificata una riduzione di vitalità con un valore di circa 76 %-77 %. Gli esperimenti hanno mostrato come la concentrazione di collagene, al contrario, non ha influenzato la vitalità cellulare sia con che senza la presenza di riboflavina. Probabilmente la causa della diminuzione della vitalità cellulare, aspetto di fondamentale importanza per lo sviluppo di scaffold biomimetici, sia da imputarsi all'elevata concentrazione di riboflavina (0,5 mM) utilizzata in questo studio (Figura 5.4).

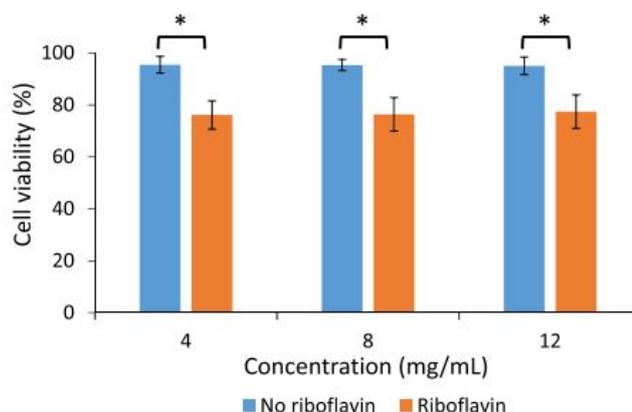


Figura 5.4: Vitalità dei condrociti negli idrogeli di collagene con e senza la reticolazione della riboflavina [51].

Ibusukie e i suoi collaboratori hanno scoperto che la vitalità dei condrociti diminuisce più dell'80 % con l'aggiunta di riboflavina 0,5 mM, mentre, non vi è alcuna diminuzione quando si aggiunge una concentrazione di riboflavina pari a 0,25 mM.

Ciò suggerisce che una concentrazione intermedia di riboflavina può essere il compromesso ideale per garantire sia un'elevata vitalità cellulare che elevate proprietà meccaniche.

Inoltre, all'interno del suo studio, Ibusukie mostra come la vitalità cellulare risulti essere influenzata anche dal tempo di esposizione alla luce blu.

Sicuramente, per studi futuri, sarebbe interessante approfondire quest'ultimo aspetto.

Ad esempio, potrebbe essere rilevante cercare la correlazione tra concentrazione di riboflavina e tempo di esposizione alla luce blu della stessa, in modo tale da ottimizzare le proprietà della riboflavina e quindi le proprietà di stampabilità dell'idrogelo di collagene.

Tutto ciò potrebbe fornire un valido contributo allo sviluppo del materiale ideale da utilizzare per la tecnica del bioprinting 3D, in modo tale da poter offrire una soluzione ottimale, ed efficace, per l'ingegneria dei tessuti.

Bibliografia

- [1] Alyssa J. Miller e Jason R. Spence. «In vitro models to study human lung development, disease and homeostasis». In: *Physiology* 32.3 (2017), pp. 246–260. ISSN: 15489221. DOI: 10.1152/physiol.00041.2016 (cit. alle pp. 1, 2, 10).
- [2] Roberta Nossa, Joana Costa, Ludovica Cacopardo e Arti Ahluwalia. «Breathing in vitro: Designs and applications of engineered lung models». In: *Journal of Tissue Engineering* 12 (2021). ISSN: 20417314. DOI: 10.1177/20417314211008696 (cit. alle pp. 1, 2).
- [3] Bruce M. Carlson. «Chapter 11 - The Respiratory System». In: *The Human Body Linking Structure and Function* (2019), pp. 11–36 (cit. alle pp. 3–6).
- [4] Laura Botta. *FISIOLOGIA GENERALE*. Dipartimento di Biologia e Biotecnologie L.Spallanzani sez. Fisiologia Generale, 2018 (cit. a p. 4).
- [5] C.L. Stanfield. *Fisiologia*. Edises, 2017. ISBN: 9788879599726. URL: <https://books.google.it/books?id=UHSzswEACAAJ> (cit. alle pp. 5, 6).
- [6] Zachary Galliger, Caleb D. Vogt e Angela Panoskaltzis-Mortari. «3D bio-printing for lungs and hollow organs». In: *Translational Research* 211 (2019), pp. 19–34. ISSN: 18781810. DOI: 10.1016/j.trsl.2019.05.001. URL: <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2019.05.001> (cit. a p. 6).
- [7] Lars Knudsen e Matthias Ochs. «The micromechanics of lung alveoli: structure and function of surfactant and tissue components». In: *Histochemistry and Cell Biology* 150.6 (2018), pp. 661–676. ISSN: 1432119X. DOI: 10.1007/s00418-

- 018-1747-9. URL: <http://dx.doi.org/10.1007/s00418-018-1747-9> (cit. alle pp. 6, 7).
- [8] Mary Mann Jong Chang, Laura Shih e Reen Wu. «Pulmonary Epithelium: Cell Types and Functions». In: *The Pulmonary Epithelium in Health and Disease* (2008), pp. 1–26. DOI: 10.1002/9780470727010.ch1 (cit. a p. 6).
- [9] Zuzana Nova, Henrieta Skovierova e Andrea Calkovska. «Alveolar-capillary membrane-related pulmonary cells as a target in endotoxin-induced acute lung injury». In: *International Journal of Molecular Sciences* 20.4 (2019). ISSN: 14220067. DOI: 10.3390/ijms20040831 (cit. a p. 7).
- [10] Viviana Nacci, Gianluca Ciardelli, Chiara Tonda-Turo e Michela Licciardello. «Membrane nanofibrose a base di policaprolattone/gelatina ottenute tramite l'elettrospinning per ricreare in vitro la membrana basale della barriera alveolo capillare». Politecnico di Torino, 2019 (cit. alle pp. 8, 10).
- [11] Esra Roan e Christopher M. Waters. «What do we know about mechanical strain in lung alveoli?» In: *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 301.5 (2011), pp. 625–635. ISSN: 10400605. DOI: 10.1152/ajplung.00105.2011 (cit. a p. 8).
- [12] Marta Kapałczyńska et al. «2D and 3D cell cultures – a comparison of different». In: *Archives of Medical Science* 14.4 (2016), pp. 910–919 (cit. alle pp. 8, 10, 12, 15).
- [13] Jungwoo Lee, Meghan J. Cuddihy e Nicholas A. Kotov. «Three-dimensional cell culture matrices: State of the art». In: *Tissue Engineering - Part B: Reviews* 14.1 (2008), pp. 61–86. ISSN: 19373368. DOI: 10.1089/teb.2007.0150 (cit. a p. 8).
- [14] Rasheena Edmondson, Jessica Jenkins Broglie, Audrey F. Adcock e Liju Yang. «Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors». In: *Assay and Drug Development Technologies* 12.4 (2014), pp. 207–218. ISSN: 15578127. DOI: 10.1089/adt.2014.573 (cit. alle pp. 9, 11, 13, 15).

- [15] SubhashChandra Parija e Jharna Mandal. «Ethics of involving animals in research». In: *Tropical Parasitology* 3.1 (2013), p. 4. ISSN: 2229-5070. DOI: 10.4103/2229-5070.113884 (cit. a p. 9).
- [16] S. Tawqeer Rashid, Henryk J. Salacinski, George Hamilton e Alexander M. Seifalian. «The use of animal models in developing the discipline of cardiovascular tissue engineering: A review». In: *Biomaterials* 25.9 (2004), pp. 1627–1637. ISSN: 01429612. DOI: 10.1016/S0142-9612(03)00522-2 (cit. a p. 10).
- [17] Iris Ribitsch et al. «Large Animal Models in Regenerative Medicine and Tissue Engineering: To Do or Not to Do». In: *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 8.August (2020), pp. 1–28. ISSN: 22964185. DOI: 10.3389/fbioe.2020.00972 (cit. a p. 10).
- [18] Dhruva K. Mishra, Jason H. Sakamoto, Michael J. Thrall, Brandi N. Baird, Shanda H. Blackmon, Mauro Ferrari, Jonathan M. Kurie e Min P. Kim. «Human Lung Cancer Cells Grown in an Ex Vivo 3D Lung Model Produce Matrix Metalloproteinases Not Produced in 2D Culture». In: *PLoS ONE* 7.9 (2012), pp. 3–12. ISSN: 19326203. DOI: 10.1371/journal.pone.0045308 (cit. alle pp. 11–13).
- [19] Dipasri Konar, Mahesh Devarasetty, Didem V. Yildiz, Anthony Atala e Sean V. Murphy. «Lung-On-A-Chip Technologies for Disease Modeling and Drug Development». In: *Biomedical Engineering and Computational Biology* 7s1 (2016), BECB.S34252. ISSN: 1179-5972. DOI: 10.4137/becb.s34252 (cit. a p. 13).
- [20] Dongeun Huh, Benjamin D. Matthews, Akiko Mammoto, Martin Montoya-Zavala, Hong Yuan Hsin e Donald E. Ingber. «Reconstituting organ-level lung functions on a chip». In: *Science* 328.5986 (2010), pp. 1662–1668. ISSN: 00368075. DOI: 10.1126/science.1188302 (cit. a p. 13).
- [21] Noelia Campillo e Vinicius Rosa Oliveira. «Alveolus Lung-on-a-Chip Platform : A Proposal». In: (2021) (cit. alle pp. 14, 16, 17).

- [22] Milica Nikolic, Tijana Sustersic e Nenad Filipovic. «In vitro models and on-chip systems: Biomaterial interaction studies with tissues generated using lung epithelial and liver metabolic cell lines». In: *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 6.SEP (2018), pp. 1–13. ISSN: 22964185. DOI: 10.3389/fbioe.2018.00120 (cit. a p. 14).
- [23] Ju Young Park, Jinah Jang e Hyun Wook Kang. «3D Bioprinting and its application to organ-on-a-chip». In: *Microelectronic Engineering* 200.January (2018), pp. 1–11. ISSN: 01679317. DOI: 10.1016/j.mee.2018.08.004. URL: <https://doi.org/10.1016/j.mee.2018.08.004> (cit. a p. 14).
- [24] Chungmin Han, Joseph M Labuz, Shuichi Takayama e Jaesung Park. «Organs-on-a-Chip». In: (2021), pp. 717–746 (cit. a p. 16).
- [25] Cristina Castells-sala, Mireia Alemany Ribes, Boston Children e Lourdes Recha. «Current Applications of Tissue Engineering in Biomedicine». In: *Journal of Biochips Tissue Chips* s2.August 2015 (2015). DOI: 10.4172/2153-0777.s2-004 (cit. alle pp. 17–19).
- [26] Qiu Li Loh e Cleo Choong. «Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: Role of porosity and pore size». In: *Tissue Engineering - Part B: Reviews* 19.6 (2013), pp. 485–502. ISSN: 19373368. DOI: 10.1089/ten.teb.2012.0437 (cit. a p. 18).
- [27] Dietmar W. Hutmacher, Tim B.F. Woodfield e Paul D. Dalton. *Scaffold Design and Fabrication*. 2014, pp. 311–346. ISBN: 9780124201453. DOI: 10.1016/B978-0-12-420145-3.00010-9 (cit. a p. 18).
- [28] Ippokratis Pountos, Nazzar Tellisi, Mohammad Ali Darabi, Ahmet Erdem, Tamer Mohamed, Murat Guvendiren e Nureddin Ashammakhi. *3D Bioprinting*. 2021. DOI: 10.1007/978-3-030-49100-0_16 (cit. alle pp. 18–20, 25).
- [29] Irene Giovanetto, Gianluca Ciardelli, Chiara Tonda-Turo e Michela Licciardello. «Idrogel di collagene biomimetici per la stampa 3D di modelli in vitro del tessuto polmonare». Politecnico di Torino, 2019 (cit. alle pp. 20, 28, 29, 34, 57, 65, 66).

- [30] Seyed Hossein Mahfouzi, Seyed Hamid Safiabadi Tali e Ghassem Amoabediny. «3D bioprinting for lung and tracheal tissue engineering: Criteria, advances, challenges, and future directions». In: *Bioprinting* 21.4 (2021). ISSN: 24058866. DOI: 10.1016/j.bprint.2020.e00124 (cit. alle pp. 21–23, 50).
- [31] Małgorzata K. Włodarczyk-Biegun e Aránzazu del Campo. «3D bioprinting of structural proteins». In: *Biomaterials* 134.May (2017), pp. 180–201. ISSN: 18785905. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2017.04.019 (cit. alle pp. 21–24, 50).
- [32] C. F. Marques, G. S. Diogo, S. Pina, J. M. Oliveira, T. H. Silva e R. L. Reis. «Collagen-based bioinks for hard tissue engineering applications: a comprehensive review». In: *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 30.3 (2019). ISSN: 15734838. DOI: 10.1007/s10856-019-6234-x. URL: <http://dx.doi.org/10.1007/s10856-019-6234-x> (cit. a p. 21).
- [33] Ishita Matai, Gurvinder Kaur, Amir Seyedsalehi, Aneesah McClinton e Cato T. Laurencin. «Progress in 3D bioprinting technology for tissue/organ regenerative engineering». In: *Biomaterials* 226.September 2019 (2020), p. 119536. ISSN: 18785905. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2019.119536. URL: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119536> (cit. alle pp. 22, 23, 50).
- [34] Sandhya Alice Varghese, Sanjay Mavinkere Rangappa, Suchart Siengchin e Jyotishkumar Parameswaranpillai. *Natural polymers and the hydrogels prepared from them*. 2019, pp. 17–47. ISBN: 9780128164211. DOI: 10.1016/B978-0-12-816421-1.00002-1 (cit. alle pp. 26, 27).
- [35] Shuai Wang, Jia Min Lee e Wai Yee Yeong. «Smart hydrogels for 3D bioprinting». In: *International Journal of Bioprinting* 1.1 (2015), pp. 3–14. ISSN: 24248002. DOI: 10.18063/IJB.2015.01.005 (cit. a p. 26).
- [36] Ana Marina Ferreira, Piergiorgio Gentile, Valeria Chiono e Gianluca Ciardelli. «Collagen for bone tissue regeneration». In: *Acta Biomaterialia* 8.9 (2012), pp. 3191–3200. ISSN: 17427061. DOI: 10.1016/j.actbio.2012.06.014. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2012.06.014> (cit. a p. 29).

- [37] Brian M. Sicari, Ricardo Londono e Stephen F. Badylak. «Extracellular Matrix as a Bioscaffold for Tissue Engineering». In: *Tissue Engineering: Second Edition* (2014), pp. 149–175. DOI: 10.1016/B978-0-12-420145-3.00005-5 (cit. a p. 29).
- [38] Karl E Kadler, David F Holmes, John A Trotter e John A Chapman. «Review Article: Collagen fibril formation Karl». In: *Biochem. J.* 11 (1996), pp. 1–11 (cit. alle pp. 30, 33).
- [39] Andrew R. McCluskey, Kennes S.W. Hung, Bartosz Marzec, Julien O. Sindt, Nico A.J.M. Sommerdijk, Philip J. Camp e Fabio Nudelman. «Disordered Filaments Mediate the Fibrillogenesis of Type I Collagen in Solution». In: *Biomacromolecules* 21.9 (2020), pp. 3631–3643. ISSN: 15264602. DOI: 10.1021/acs.biomac.0c00667 (cit. alle pp. 30, 31, 89).
- [40] Bor Shuang Liaw et al. «Effect of in vitro collagen fibrillogenesis on Langmuir-Blodgett (LB) deposition for cellular behavior regulation». In: *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 179.March (2019), pp. 48–55. ISSN: 18734367. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2019.03.053 (cit. a p. 30).
- [41] Karl E. Kadler. «Fell Muir Lecture: Collagen fibril formation in vitro and in vivo». In: *International Journal of Experimental Pathology* 98.1 (2017), pp. 4–16. ISSN: 13652613. DOI: 10.1111/iep.12224 (cit. a p. 30).
- [42] Jieliang Zhu e Laura J. Kaufman. «Collagen I self-assembly: Revealing the developing structures that generate turbidity». In: *Biophysical Journal* 106.8 (2014), pp. 1822–1831. ISSN: 15420086. DOI: 10.1016/j.bpj.2014.03.011. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2014.03.011> (cit. alle pp. 31, 32).
- [43] Marcel E Nimni. *Collagen: Biochemistry, Volume 1*. ISBN: 9781315891699 (cit. alle pp. 32, 34).
- [44] David F. Holmes, Yinhui Lu, Tobias Starborg e Karl E. Kadler. *Collagen Fibril Assembly and Function*. 1^a ed. Vol. 130. Elsevier Inc., 2018, pp. 107–142. DOI: 10.1016/bs.ctdb.2018.02.004. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.ctdb.2018.02.004> (cit. alle pp. 32, 33).

- [45] Meilian Zou, Huan Yang, Haibo Wang, Haiyin Wang, Juntao Zhang, Benmei Wei, Hanjun Zhang e Dong Xie. «Detection of type I collagen fibrils formation and dissociation by a fluorescence method based on thioflavin T». In: *International Journal of Biological Macromolecules* 92 (2016), pp. 1175–1182. ISSN: 18790003. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.08.027. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.08.027> (cit. alle pp. 34–37, 62, 89, 101).
- [46] Alexander A. Maskevich, Vitali I. Stsiapura, Valeriy A. Kuzmitsky, Irina M. Kuznetsova, Olga I. Povarova, Vladimir N. Uversky e Konstantin K. Turoverov. «Spectral properties of thioflavin T in solvents with different dielectric properties and in a fibril-incorporated form». In: *Journal of Proteome Research* 6.4 (2007), pp. 1392–1401. ISSN: 15353893. DOI: 10.1021/pr0605567 (cit. alle pp. 34, 58).
- [47] Mingyan Yan e Xinping Wang. «Study on the kinetic self-assembly of type I collagen from tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin using the fluorescence probe thioflavin T». In: *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 203 (2018), pp. 342–347. ISSN: 13861425. DOI: 10.1016/j.saa.2018.05.083. URL: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2018.05.083> (cit. a p. 34).
- [48] A. Tirella, T. Liberto e A. Ahluwalia. «Riboflavin and collagen: New crosslinking methods to tailor the stiffness of hydrogels». In: *Materials Letters* 74 (2012), pp. 58–61. ISSN: 0167577X. DOI: 10.1016/j.matlet.2012.01.036. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.matlet.2012.01.036> (cit. alle pp. 38, 42, 44, 45, 63, 94).
- [49] Jiseung Heo, Rachel H. Koh, Whuisu Shim, Hwan D. Kim, Hyun Gu Yim e Nathaniel S. Hwang. «Riboflavin-induced photo-crosslinking of collagen hydrogel and its application in meniscus tissue engineering». In: *Drug Delivery and Translational Research* 6.2 (2016), pp. 148–158. ISSN: 21903948. DOI: 10.1007/s13346-015-0224-4 (cit. alle pp. 38, 63).
- [50] Harvey Rich, Marianne Odlyha, Umber Cheema, Vivek Mudera e Laurent Bozec. «Effects of photochemical riboflavin-mediated crosslinks on the physical

- properties of collagen constructs and fibrils». In: *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 25.1 (2014), pp. 11–21. ISSN: 09574530. DOI: 10.1007/s10856-013-5038-7 (cit. alle pp. 38, 40, 41).
- [51] Nicole Diamantides, Louis Wang, Tylar Pruiksma, Joseph Siemiatkoski, Caroline Dugopolski, Sonya Shortkroff, Stephen Kennedy e Lawrence J. Bonassar. «Correlating rheological properties and printability of collagen bioinks: The effects of riboflavin photocrosslinking and pH». In: *Biofabrication* 9.3 (2017). ISSN: 17585090. DOI: 10.1088/1758-5090/aa780f (cit. alle pp. 46, 47, 49, 93, 94, 102, 104, 108, 109).
- [52] Thermo Fisher. *Bovine Collagen Type I Powder – Blafar*. (Cit. alle pp. 53, 54).
- [53] Thermo Fisher Scientific. *MEM (Minimum Essential Medium) di Thermo Fisher Scientific*. URL: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/11095080> (cit. a p. 54).
- [54] Egor Osidak et al. «Viscoll collagen solution as a novel bioink for direct 3D bioprinting». In: *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 30 (mar. 2019). DOI: 10.1007/s10856-019-6233-y (cit. alle pp. 54, 55).
- [55] Sigma-Aldrich. *Acetic acid, ACS reagent, 99.7 % | CH₃CO₂H | Sigma-Aldrich*. (Cit. a p. 55).
- [56] Sigma-Aldrich. *Sodium hydroxide, ACS reagent, 97.0 %, pellets | NaOH | Sigma-Aldrich*. (Cit. a p. 55).
- [57] Sigma-Aldrich. *THIOFLAVIN T Sigma Prod. No. T3516 Store at room temperature*. (Cit. a p. 59).
- [58] BMG LABTECH. *Microplate Reader | Plate Reader - BMG LABTECH* (cit. a p. 61).
- [59] Sigma-Aldrich. *RIBOFLAVIN Sigma Prod.* (Cit. a p. 63).
- [60] Anton Paar. *Reometro*. URL: <https://www.anton-paar.com/it-it/prodotti/dettagli/reometri-mcr-102-302-502/> (cit. a p. 66).

-
- [61] Storage Conditions e Intended Use. «MRC-5». In: (), pp. 1–6 (cit. alle pp. 68, 69).
- [62] Thermo Scientific. *Dimethylsulfoxide (DMSO)*, Thermo Fisher Scientific. URL: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/85190> (cit. a p. 70).
- [63] Thermo Fisher. *Fetal bovine serum (FBS)* Thermo Fisher Scientific (cit. a p. 70).
- [64] Thermo Scientific. *Penicillin-Streptomycin*, Thermo Fisher Scientific. URL: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/15140122> (cit. a p. 71).
- [65] Thermo Fisher Scientific. *Trypsin-EDTA (0.25 %), phenol red*, Thermo Fisher Scientific. URL: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/25200056> (cit. alle pp. 71, 72).
- [66] S. O. Sarrigiannidis, J. M. Rey, O. Dobre, C. González-García, M. J. Dalby e M. Salmeron-Sanchez. «A tough act to follow: collagen hydrogel modifications to improve mechanical and growth factor loading capabilities». In: *Materials Today Bio* 10. January (2021). ISSN: 25900064. DOI: 10.1016/j.mtbio.2021.100098 (cit. a p. 86).
- [67] H. Holback, Y. Yeo e K. Park. *Hydrogel swelling behavior and its biomedical applications*. Woodhead Publishing Limited, 2011, pp. 3–24. DOI: 10.1533/9780857091383.1.3. URL: <http://dx.doi.org/10.1533/9780857091383.1.3> (cit. a p. 87).
- [68] Koichi Morimoto, Kazuya Kawabata, Saori Kunii, Kaori Hamano, Takuya Saito e Ben'Ichiro Tonomura. «Characterization of type I collagen fibril formation using thioflavin T fluorescent dye». In: *Journal of Biochemistry* 145.5 (2009), pp. 677–684. ISSN: 0021924X. DOI: 10.1093/jb/mvp025 (cit. alle pp. 90, 101).

- [69] Jonathan M. Zuidema, Christopher J. Rivet, Ryan J. Gilbert e Faith A. Morrison. «A protocol for rheological characterization of hydrogels for tissue engineering strategies». In: *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials* 102.5 (2014), pp. 1063–1073. ISSN: 15524981. DOI: 10.1002/jbm.b.33088 (cit. a p. 90).
- [70] Nicole Diamantides, Caroline Dugopolski, Eric Blahut, Stephen Kennedy e Lawrence J. Bonassar. «High density cell seeding affects the rheology and printability of collagen bioinks». In: *Biofabrication* 11.4 (2019). ISSN: 17585090. DOI: 10.1088/1758-5090/ab3524 (cit. alle pp. 104–106, 108).