



**Politecnico  
di Torino**

## Politecnico di Torino

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica

A.A. 2022/2023

Sessione di Laurea Magistrale: luglio 2023

# **Sviluppo di un modello biomimetico in vitro di barriera alveolo-capillare che simula il movimento respiratorio in condizioni di interfaccia aria-liquido**

**Relatrice:**

Prof.ssa Chiara Tonda-Turo

**Candidato:**

Massimiliano Collu

**Correlatore:**

Prof. Gianluca Ciardelli

**Tutor di laboratorio:**

Dott.ssa Michela Licciardello



# INDICE

<b>ABSTRACT</b> .....	5
<b>CAPITOLO 1: INTRODUZIONE</b> .....	7
<b>1.1 Anatomia del polmone</b> .....	7
<b>1.2 Alveoli polmonari e barriera alveolo-capillare</b> .....	8
<b>1.3 Effetto della stimolazione meccanica</b> .....	12
<b>1.4 Patologie polmonari</b> .....	13
<b>1.5 Modelli di polmone</b> .....	16
<b>1.5.1 Modelli animali</b> .....	17
<b>1.5.2 Modelli <i>ex vivo</i></b> .....	18
<b>1.5.3 Modelli <i>in vitro</i></b> .....	19
1.5.3.1 Cellule e colture cellulari.....	20
1.5.3.2 Caratteristiche della membrana di supporto.....	25
1.5.3.3 Fabbricazione delle membrane.....	27
1.5.3.4 Bioreattori.....	30
1.5.3.5 Modelli avanzati di barriera alveolo-capillare.....	32
1.5.3.6 <i>Lung-on-a-chip</i> .....	40
<b>CAPITOLO 2: MATERIALI E METODI</b> .....	45
<b>2.1 Materiali</b> .....	45
<b>2.1.1 Bioreattore LiveBox2</b> .....	45
<b>2.1.2 Componenti del circuito</b> .....	47
<b>2.1.3 Materiali delle membrane</b> .....	49
2.1.3.1 Caratteristiche e proprietà dei materiali.....	49
<b>2.1.4 Sensore di pressione</b> .....	54
<b>2.1.5 Linee cellulari</b> .....	54
<b>2.1.6 Materiali per la marcatura cellulare</b> .....	54
<b>2.2 Metodi</b> .....	55
<b>2.2.1 Processo di fabbricazione delle membrane in PCL/Gel</b> .....	55
<b>2.2.2 Misurazioni di pressione</b> .....	55
2.2.2.1 Setup del sistema.....	56
2.2.2.2 Fasi di acquisizione della pressione.....	58

2.2.2.3 Elaborazione dei dati .....	59
2.2.2.4 Analisi statistica.....	60
<b>2.2.3 Test cellulari .....</b>	<b>60</b>
2.2.3.1 Processo di sterilizzazione.....	60
2.2.3.2 Semina delle cellule HuLEC-5A in camera basale .....	61
2.2.3.3 Test di adesione cellulare .....	62
2.2.3.4 Semina delle cellule A549 in camera apicale.....	63
2.2.3.5 Colture cellulari all'interno del bioreattore .....	63
2.2.3.6 Immunofluorescenza .....	64
2.2.3.7 Colture cellulari in inserti Transwell® .....	65
<b>CAPITOLO 3: RISULTATI E DISCUSSIONE .....</b>	<b>67</b>
<b>3.1 Misurazioni di pressione.....</b>	<b>67</b>
3.1.1 Misurazioni con membrana in PET .....	67
3.1.2 Misurazioni con membrana in PCL/Gel .....	69
<b>3.2 Test cellulari .....</b>	<b>72</b>
3.2.1 Test di adesione .....	72
3.2.2 Colture cellulari in condizioni ALI.....	73
<b>CAPITOLO 4: CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI.....</b>	<b>79</b>
<b>RIFERIMENTI.....</b>	<b>82</b>
<b>RINGRAZIAMENTI.....</b>	<b>92</b>

## ABSTRACT

*In vitro* models that mimic the alveolar-capillary barrier are becoming essential research tools to test the efficacy of drugs and understand cellular responses to different stimuli, thanks to their ability to reproduce the physiological architecture and microenvironment of the human alveoli. It is well known that different mechanical forces, under physiological or pathological conditions, significantly influence cell behaviour, therefore playing an important role in maintaining the overall structure and function of the lung. Currently available systems do not reproduce all aspects of the alveolar microenvironment and the stimuli acting on it, and they are able to recreate only small components of the alveolar region.

The aim of this work was to develop a biomimetic *in vitro* model to mimic the alveolar-capillary barrier using the commercial bioreactor LiveBox2 (IVTech S.R.L., Massarosa (LU), Italy). In particular, in this work, the commercial polyethylene terephthalate (PET) was replaced with an electrospun polycaprolactone/ gelatin (PCL/Gel) membrane to mimic the alveolar basement membrane. The biomimetic membrane was accommodated between the two bioreactor chambers to recreate the architecture of the alveolar-capillary barrier. Moreover, the ALI interaction module was used to reproduce the air-liquid interface (ALI) condition, experienced by alveolar epithelial cells within the alveolar region. A mechanical actuator was used to partially occlude the basal chamber outlet tube after flow activation, thus reproducing the stimulation that occurs on alveolar tissue during breathing.

First, a pressure sensor was used to monitor the overpressure inside the basal chamber following the mechanical actuation. The measurements were repeated for two different membranes placed between bioreactor chambers: the commercial PET membrane, and the biomimetic PCL/Gel membrane. For both, a higher overpressure was observed as the occlusion level of the outlet tube increased, but since PCL/Gel membrane was more elastic, it required greater occlusion level.

Then, cell culture tests were performed seeding epithelial (A549) and endothelial (HuLEC-5A) cells on the apical and basal surface of the PCL/Gel membrane, respectively. Cells were co-cultured in the opposite side of PCL/Gel modified Transwell® inserts and inside the bioreactor chambers to compare different experimental conditions (static, dynamic with only flow and dynamic with flow and mechanical actuation). The ALI condition was

established after 3 days of co-culture by removing the A549 medium from the apical chamber. After 7 days, the staining of nuclei and cytoskeleton was performed to assess the cell adhesion and viability. Finally, the effect of different stimulation on cell behaviour was qualitatively evaluated by immunofluorescence staining.

# CAPITOLO 1: INTRODUZIONE

## 1.1 Anatomia del polmone

I polmoni sono gli organi nei quali avvengono gli scambi gassosi tra aria e sangue. Sono contenuti nella cavità toracica, e separati tra loro da uno spazio mediano, il *mediastino*, compreso tra la colonna vertebrale e lo sterno. Dal mediastino arrivano a ciascuno dei polmoni i bronchi, i vasi e i nervi che costituiscono i peduncoli polmonari. I polmoni sono avvolti da una membrana sierosa, la *pleura*, costituita da due foglietti: uno viscerale, che aderisce alla superficie dell'organo, e uno parietale, adeso alla gabbia toracica. Tra i due foglietti è presente uno spazio, la *cavità pleurica*, all'interno della quale esiste una pressione negativa che permette ai polmoni di espandersi durante l'inspirazione. Il polmone ha un alto grado di elasticità che contribuisce all'espulsione dell'aria durante l'espirazione (ritorno elastico). La superficie del polmone è percorsa da *scissure* che dividono l'organo in *lobi* (3 nel polmone destro e 2 nel polmone sinistro, Fig. 1): questi risultano distinti sia anatomicamente, sia funzionalmente, in quanto ciascuno presenta una vascolarizzazione e una ventilazione propria<sup>1</sup>.

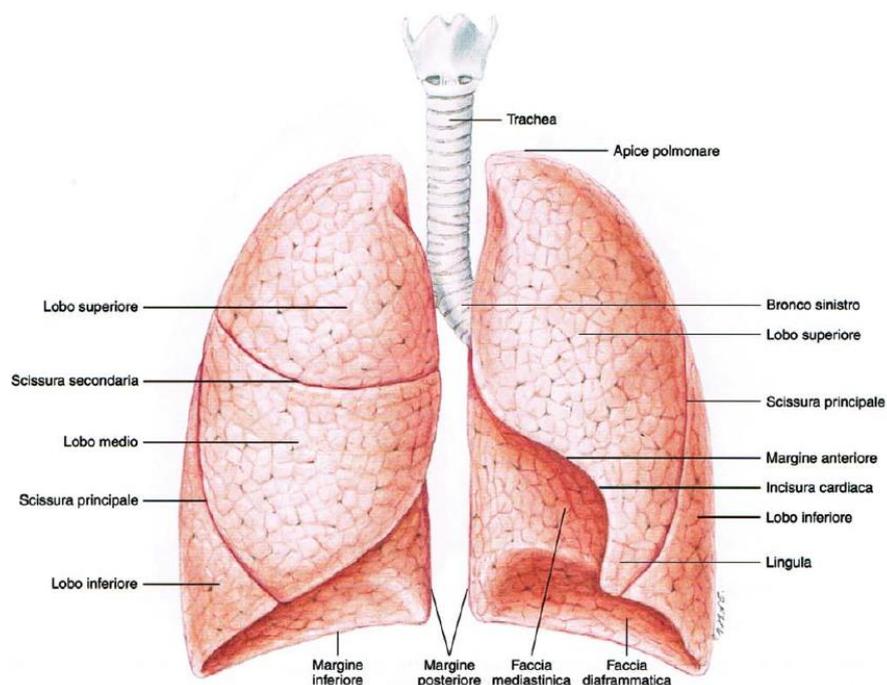


Figura 1: Polmoni visti in proiezione anteriore e suddivisione in lobi<sup>1</sup>.

All'interno di ciascun lobo si possono poi distinguere ulteriori territori, denominati *zone* o *segmenti polmonari*, sempre indipendenti dal punto di vista della funzione, ma anatomicamente uniti tra loro dal connettivo interstiziale. La suddivisione in zone indipendenti può consentire, in caso di condizioni patologiche, l'asportazione di parti del polmone meno estese, limitando in tal modo la perdita di superficie respiratoria utile. Ciascuna zona polmonare, a sua volta, comprende centinaia di entità indipendenti, che sono i *lobuli* polmonari. Ognuno di essi è fornito da un *bronco lobulare* (calibro 1 mm), che si ramifica all'interno del lobulo stesso dando origine a 3-5 *bronchioli terminali*, ciascuno dei quali provvede alla ventilazione di un *acino*, la più piccola unità funzionale del polmone. In ogni acino il bronchiolo terminale dà origine a due *bronchioli respiratori* (o *bronchioli alveolari*), che presentano lungo il loro decorso estroflessioni emisferiche, gli *alveoli* (Fig. 2a). Questi diventano sempre più numerosi procedendo verso l'estremità del bronchiolo respiratorio, che infine si suddivide in rami, i *condotti alveolari*, la cui parete è completamente formata da una successione di alveoli<sup>1</sup>.

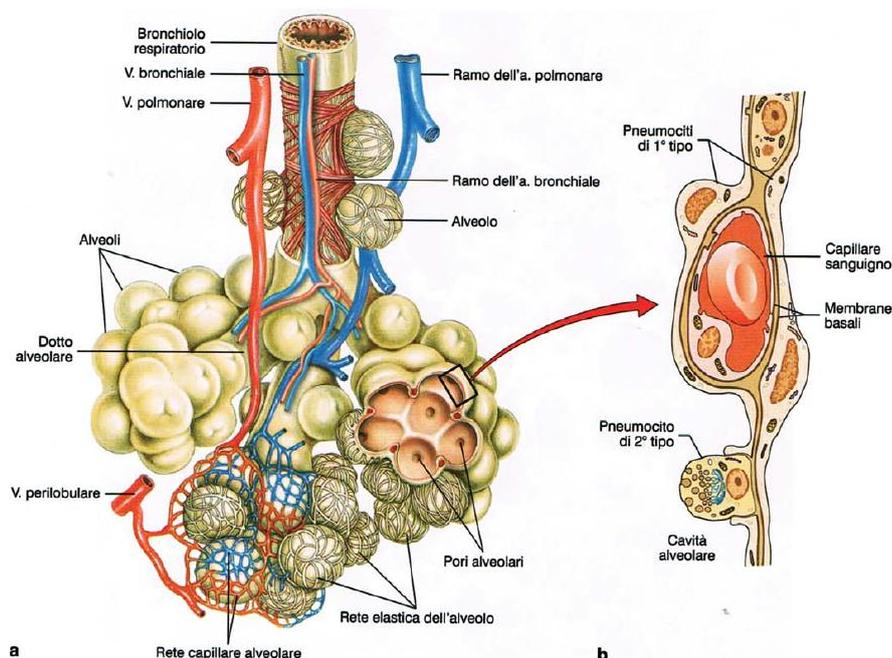
Il bronchiolo terminale identifica l'ultimo tratto dell'albero bronchiale che svolge la sola funzione di trasporto di aria: nelle ramificazioni successive, infatti, compaiono gli alveoli, e iniziano quindi anche gli scambi dei gas con il sangue. A partire dai bronchi principali che penetrano nel polmone, nelle successive ramificazioni la struttura muta per la progressiva diminuzione della componente cartilaginea e il contemporaneo aumento delle componenti elastica e muscolare. In tal modo la parete dei bronchi si fa sempre più flessibile e quindi adattabile ai cambiamenti di volume che hanno luogo durante le fasi dell'atto respiratorio. Anche le arterie polmonari si ramificano decorrendo a lato dei bronchi, fino a che, a livello degli alveoli, forniscono reti capillari<sup>1</sup>.

All'interno di ogni polmone si contano circa 300 milioni di alveoli polmonari. La quantità di aria che viene inalata ed emessa con un'inspirazione ed espirazione normale è di circa 500 cm<sup>3</sup><sup>1</sup>.

## 1.2 Alveoli polmonari e barriera alveolo-capillare

La parete degli alveoli è costituita da un epitelio di rivestimento (epitelio alveolare) e da un sottostante strato connettivale. L'epitelio alveolare presenta due tipologie di cellule epiteliali: pneumociti di tipo I, cellule appiattite che ricoprono circa il 90% della superficie

alveolare e consentono gli scambi gassosi, e pneumociti di tipo II, che sono cellule tondeggianti, molto più piccole ma più numerose di quelle di tipo I (Fig. 2b) <sup>1</sup>.



**Figura 2:** *a) Parte terminale dell'albero bronchiale e alveoli polmonari; b) struttura della parete alveolare* <sup>1</sup>.

Gli pneumociti di tipo II hanno diverse funzioni: in primo luogo secernono un liquido surfattante, che riveste la superficie interna della parete alveolare e, modulando la tensione superficiale all'interfaccia, ha la funzione di mantenere dilatati gli alveoli e quindi aumentare la superficie utilizzabile per gli scambi gassosi tra aria e sangue. Inoltre, gli pneumociti di tipo II fungono anche da cellule progenitrici, in quanto sono capaci sia di proliferare, sia di differenziarsi in cellule di tipo I, contribuendo a mantenere l'integrità dello strato cellulare <sup>1,2</sup>. La regolazione di questi processi ha un ruolo fondamentale nello sviluppo del polmone, ma anche nella riparazione dell'epitelio alveolare in seguito a un danno <sup>2</sup>.

Entrambe le tipologie di cellule epiteliali sono coinvolte nella risposta immunitaria, ed esprimono dei recettori (*pattern recognition receptors*, o PRR) che riconoscono i pattern molecolari associati ad agenti patogeni. Una volta avvenuto il riconoscimento, le cellule attivano delle cascate di segnali che portano al rilascio di citochine/chemochine (come le

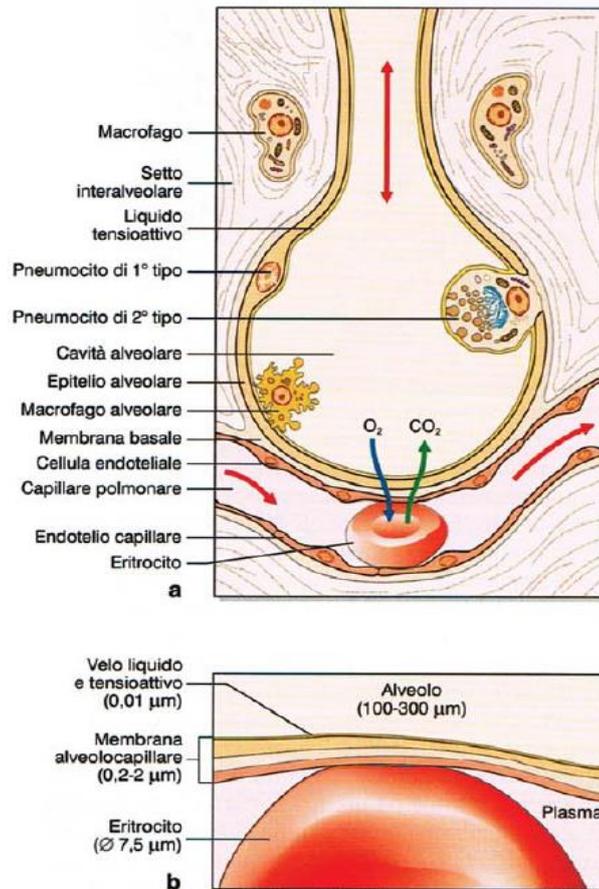
interleuchine IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , IL-6 e IL-8, o il fattore di necrosi tumorale TNF) e al reclutamento di cellule che intervengono nel processo infiammatorio<sup>3</sup>.

Gli pneumociti formano una barriera altamente impermeabile nei confronti di proteine e soluti. La permeabilità dipende in particolare dall'espressione e regolazione di complessi proteici che formano giunzioni strette e giunzioni aderenti tra le cellule, limitando quindi il trasporto paracellulare<sup>3,4</sup>. Oltre alle proprietà della barriera, un altro aspetto importante per preservare la funzione del polmone è la capacità di rimuovere il fluido alveolare in eccesso, principalmente attraverso meccanismi di trasporto sodio-dipendenti. Anche il surfactante prodotto dagli pneumociti di tipo II ha un ruolo significativo nel mantenere un normale equilibrio fluidico, e una sua carenza può portare allo sviluppo di edema polmonare<sup>4</sup>.

Oltre alle cellule epiteliali sono inoltre presenti, nella parete dell'alveolo o all'interno del lume, i macrofagi alveolari<sup>1</sup>. Essi rappresentano un fondamentale elemento di difesa, in quanto sono coinvolti nell'eliminazione di agenti patogeni e sostanze tossiche penetrate in profondità durante la respirazione, e inoltre prevengono l'accumulo di proteine e lipidi nel microambiente alveolare, contribuendo a mantenere l'omeostasi<sup>5,6</sup>. La comunicazione tra macrofagi alveolari e cellule epiteliali è un fattore chiave nella modulazione della risposta infiammatoria<sup>6</sup>.

Al di sotto dell'epitelio si trova una lamina basale che, in più punti, si fonde con la lamina basale dei capillari alveolari. La parete dei capillari che si interfacciano con gli alveoli è formata da un endotelio continuo privo di pori o fenestrature, e ogni capillare è a contatto con più alveoli, anche di acini diversi<sup>1</sup>. Nello spazio interstiziale presente tra le due lamine basali si trovano fibroblasti, cellule infiammatorie e proteine della matrice extracellulare (prevalentemente rappresentate da fibre collagene)<sup>5</sup>. I fibroblasti polmonari, in seguito a una lesione tissutale o all'insorgere di alcune patologie, si differenziano in miofibroblasti (con funzionalità contrattile), migrano nel sito dove è presente la lesione e sintetizzano componenti della matrice extracellulare (ECM), contribuendo alla riparazione del tessuto. Tuttavia, se la loro attività è eccessiva, può causare ulteriori danni al polmone<sup>6</sup>.

La barriera alveolo-capillare risulta quindi formata da diversi strati: epitelio alveolare, lamine basali dell'epitelio alveolare e del capillare adiacente (contigue tra loro e spesso fuse in una lamina unica), spazio interstiziale ed endotelio capillare. Lo spessore della barriera varia da 0.2 a 2  $\mu\text{m}$ , con un valore medio di 0.5  $\mu\text{m}$  (Fig. 3a-b)<sup>1</sup>.



*Figura 3: a) Rappresentazione schematica della struttura degli alveoli e dei capillari polmonari; b) dettaglio dell'interfaccia alveolo-capillare <sup>1</sup>.*

Il meccanismo della respirazione è guidato da gradienti di pressione: in particolare ciò che genera il flusso d'aria è la differenza tra la pressione alveolare e quella atmosferica (all'apertura delle vie aeree). La pressione alveolare a sua volta è determinata dalla pressione pleurica (generata dalla forza di contrazione dei muscoli respiratori) e dal ritorno elastico del polmone, che è il risultato delle proprietà elastiche delle pareti alveolari e del tessuto connettivo polmonare <sup>5</sup>.

A livello della barriera alveolo-capillare, lo scambio di gas tra aria e sangue avviene per semplice diffusione passiva, guidata dalle differenze di pressione parziale di ossigeno e anidride carbonica che si hanno negli alveoli e nei capillari. Per cui questo processo non richiede dispendio di energia da parte dell'organismo, a differenza della ventilazione (trasporto dell'aria lungo le vie aeree) e della perfusione (flusso di sangue all'interno dei vasi), che invece sono processi convettivi e richiedono l'utilizzo di energia <sup>7</sup>.

### 1.3 Effetto della stimolazione meccanica

Tutti i diversi tipi di cellule presenti nel polmone, e in particolare quelle che compongono la barriera alveolo-capillare, sono soggette ad un ambiente dinamico, a causa delle sollecitazioni meccaniche che subiscono durante la respirazione. È ormai dimostrato che questi stimoli influenzano la proliferazione, differenziazione, migrazione e il metabolismo cellulari. I meccanorecettori che si trovano sulla superficie delle cellule, infatti, recepiscono gli stimoli meccanici e li convertono in segnali biochimici, attivando una serie di percorsi di segnalazione che sono coinvolti nell'espressione di geni e nella sintesi di proteine. Gli sforzi a cui sono sottoposte le cellule possono inoltre alterarne la morfologia e, se eccessivi, causarne l'apoptosi, oltre a indurre il rilascio di citochine implicate in processi infiammatori. Infine, possono aumentare la permeabilità della barriera alveolare nei confronti di piccole molecole idrofiliche<sup>8</sup>. In riferimento alle funzioni specifiche degli pneumociti di tipo II, si suppone che la deformazione ciclica di queste cellule possa essere il principale stimolo per la secrezione del surfactante, oltre a indurre la differenziazione di queste cellule in pneumociti di tipo I. Appare quindi chiaro come la sollecitazione meccanica abbia un ruolo importante nel mantenimento della struttura e della funzione polmonare<sup>2</sup>.

Le forze che agiscono sulla regione alveolare sono per lo più dovute ai cicli di inspirazione ed espirazione (sollecitazioni di trazione ciclica), che provocano una deformazione degli alveoli e quindi delle cellule che compongono la barriera, ma in parte anche al flusso del sangue capillare (es. sforzi di taglio) e del fluido interstiziale<sup>2,8,9</sup>. In un polmone sano, in condizioni di riposo, normalmente il ciclo respiratorio ha una frequenza di 0.20 Hz (12-15 cicli di inspirazione-espirazione al minuto). Sotto queste condizioni, la membrana basale della barriera alveolo-capillare subisce una deformazione lineare del 4%. Durante un esercizio fisico intenso, la frequenza aumenta fino a 0.55 Hz (26-33 cicli al minuto), che comporta una deformazione lineare di circa il 12%. In condizioni patologiche, come la sindrome da distress respiratorio acuto, si può raggiungere una deformazione della membrana anche del 20%<sup>8</sup>.

Chiaramente, l'allungamento cellulare dipenderà anche dalla rigidità del tessuto alveolare, e quindi dal modulo di Young della membrana basale, che in genere è compreso del range 1-2 kPa. In condizioni patologiche come la fibrosi polmonare idiopatica, però, la rigidità della membrana può aumentare fino a raggiungere un modulo elastico di 16.5

kPa, a causa di una maggiore secrezione e deposizione di proteine della ECM da parte di cellule epiteliali e fibroblasti. Questo provoca un aumento della resistenza del tessuto durante l'inspirazione e quindi una minore deformazione della membrana <sup>8,10</sup>.

L'influenza della stimolazione meccanica sulle funzioni delle cellule polmonari ha suscitato un interesse crescente negli ultimi decenni, anche a causa del diffuso utilizzo della ventilazione meccanica per il trattamento di disturbi respiratori (in cui il paziente viene esposto a stimoli che provocano deformazioni anche superiori al 20%), con il rischio che alcuni regimi di ventilazione possano addirittura aggravare il danno preesistente <sup>2,10</sup>.

## 1.4 Patologie polmonari

Le patologie che coinvolgono il sistema respiratorio sono tra le principali cause di disabilità e mortalità a livello mondiale. I polmoni sono costantemente esposti a numerosi agenti nocivi presenti nell'aria, come particelle tossiche, agenti chimici, organismi infettivi, e il fumo di tabacco <sup>11</sup>. Esistono diversi tipi di patologie polmonari, che possono interessare una o più regioni del polmone. Alcune di esse, ad esempio, colpiscono le vie aeree, e includono:

- Asma, una malattia caratterizzata da infiammazione cronica delle vie aeree e ostruzione al flusso respiratorio, che presenta sintomi quali dispnea, tosse e senso di costrizione toracica <sup>12</sup>.
- Broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO), caratterizzata da ostruzione irreversibile o non completamente reversibile del flusso aereo, ed associata ad una persistente risposta infiammatoria dovuta all'inalazione di particelle o gas irritanti. Tra i fattori di rischio il più importante è sicuramente il fumo di sigaretta. Esistono varie forme di BPCO, e in genere nei pazienti affetti da questa patologia si possono riscontrare diverse condizioni, come la bronchite cronica (caratterizzata da infiammazione cronica dell'albero bronchiale e aumento della secrezione di muco, che può portare anche ad un'ostruzione delle vie aeree) o l'enfisema, condizione che colpisce prevalentemente gli alveoli polmonari <sup>12</sup>.
- Bronchite acuta, un'infiammazione dei bronchi determinata da un processo infettivo o non infettivo, che conduce ad un danno all'epitelio bronchiale. L'infiammazione è transitoria e generalmente si risolve spontaneamente in alcune

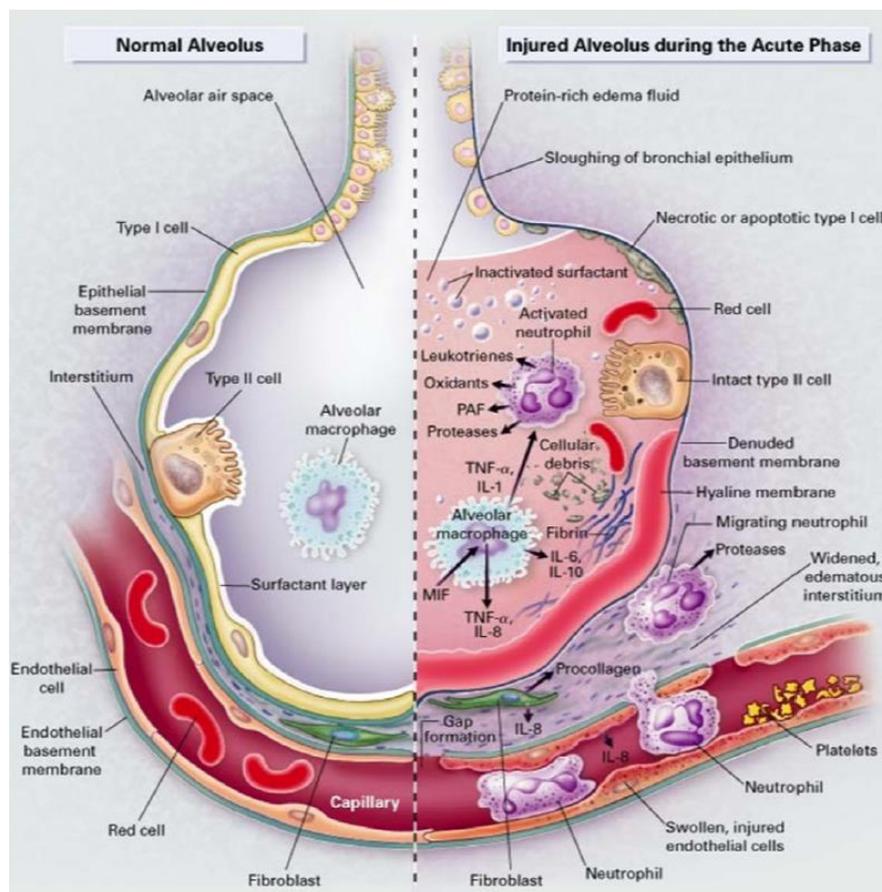
settimane. Nella maggior parte dei casi la bronchite acuta è causata da un'infezione virale<sup>12</sup>.

- Bronchiectasie, ovvero alterazioni strutturali caratterizzate da dilatazione irreversibile della parete dei bronchi, dovuta alla distruzione delle loro componenti muscolari ed elastiche (spesso in seguito ad un'infezione batterica)<sup>12</sup>.
- Fibrosi cistica, una malattia ereditaria in cui un gene difettoso porta alla formazione di muco estremamente viscoso, che provoca un'ostruzione dei dotti escretori di numerosi organi. Nei polmoni, il muco denso blocca le vie aeree, causando infezioni polmonari e rendendo difficile la respirazione<sup>12,13</sup>.

Ci sono poi importanti patologie a carico principalmente degli alveoli polmonari e della barriera alveolo-capillare. Fanno parte di questa categoria:

- Polmoniti, ovvero infezioni degli alveoli in genere provocate da agenti patogeni come batteri (principalmente *Streptococcus pneumoniae*) o virus (es. virus influenzale, coronavirus). I sintomi possono variare a seconda della gravità dell'infezione<sup>12</sup>.
- Tubercolosi (TBC), una patologia causata dal batterio *Mycobacterium tuberculosis*. L'infezione tubercolare inizia con l'ingresso del batterio all'interno dei macrofagi alveolari, nei quali si moltiplica diffondendosi poi nell'ambiente circostante<sup>12</sup>.
- Enfisema, un'alterazione della struttura acinare dovuta alla distruzione delle pareti alveolari e perdita di elasticità degli alveoli, che rimangono in uno stato di iperdistensione<sup>12</sup>.
- Edema polmonare, una condizione provocata da un'eccessiva presenza di liquidi all'interno degli alveoli, con conseguenti problemi nello scambio di gas tra alveolo e capillare. L'edema polmonare può essere provocato da problemi cardiaci (es. ipertensione, problemi alle valvole cardiache), ma anche da infezioni virali, sindrome da distress respiratorio acuto, lesioni polmonari, inalazione di fumi chimici, reazione ad alcuni farmaci<sup>14</sup>.
- Sindrome da distress respiratorio acuto (ARDS), che è la forma più grave del cosiddetto "danno acuto del polmone" (*acute lung injury*)<sup>15</sup>. Si tratta di una condizione in cui la rottura delle giunzioni cellulari presenti nella barriera alveolo-capillare porta ad un incremento della permeabilità della barriera, consentendo

l'ingresso di fluidi e mediatori dell'infiammazione, fino a causare edema polmonare e compromettere lo scambio gassoso (Fig. 4) <sup>15,16</sup>. La risposta infiammatoria acuta, che si verifica all'esordio della malattia, è seguita da una fase cronica caratterizzata dalla proliferazione dei fibroblasti polmonari. I segni della risposta infiammatoria acuta includono ipossiemia (ovvero la riduzione del contenuto di ossigeno nel sangue arterioso circolante <sup>12</sup>), ridotta compliance del polmone, aumento della permeabilità della barriera epiteliale ed endoteliale, e una ridotta capacità dell'epitelio di rimuovere il fluido alveolare in eccesso. La caratteristica distintiva della successiva fase fibroproliferativa è invece il danneggiamento della membrana basale, con un aumento nella produzione di collagene di tipo I e III nella parete alveolare (segni di fibrosi) <sup>17</sup>.



**Figura 4:** Alveolo in condizioni normali (a sinistra) e nella fase acuta della ARDS (a destra) <sup>18</sup>.

Polmonite e edema polmonare possono colpire anche la regione interstiziale compresa tra le membrane basali che sostengono l'epitelio e l'endotelio. Inoltre, l'interstizio può essere interessato anche da altre condizioni come la fibrosi polmonare idiopatica (IPF), caratterizzata da infiammazione cronica e progressivo ispessimento delle pareti alveolari, associato ad un aumento di fibre collagene a livello interstiziale. I soggetti con IPF presentano una compliance polmonare ridotta in seguito alle modificazioni delle proprietà elastiche e alla ridotta distensibilità degli alveoli <sup>12</sup>.

Esistono poi patologie che colpiscono le arterie polmonari, come l'embolia polmonare (ostruzione di una o più arterie causata da coaguli di sangue che giungono ai polmoni da altre parti dell'organismo) e l'ipertensione polmonare, o anche patologie a carico della pleura, come lo pneumotorace (presenza di aria libera all'interno della cavità pleurica) e il versamento pleurico (presenza di un eccesso di liquido nella cavità pleurica) <sup>12</sup>.

Infine, un discorso a parte va fatto per il carcinoma polmonare: uno dei tumori più diffusi e letali, si può presentare in diverse forme, e svilupparsi a partire da zone differenti del polmone, ma nel 90% dei casi si sviluppa dall'epitelio bronchiale. Il carcinoma squamoso, più frequente nei fumatori, origina dall'epitelio dei bronchi di calibro maggiore, ed è più facilmente diagnosticabile grazie alla sua localizzazione centrale e alla ricca sintomatologia che lo caratterizza. L'adenocarcinoma, invece, insorge più frequentemente in sede periferica, ovvero a partire dall'epitelio dei bronchi di calibro inferiore, ma anche a livello dei bronchioli e dell'epitelio alveolare. Spesso non presenta sintomatologia polmonare, e ha un'elevata tendenza alla metastatizzazione (minore nel caso del sottotipo bronchiolo-alveolare). Infine, il carcinoma indifferenziato a piccole cellule (o microcitoma), che ha una localizzazione centrale, costituisce circa il 20% dei carcinomi polmonari ed è la neoplasia a più alto grado di malignità, dotata di notevole capacità di diffusione a distanza per via ematica e linfatica <sup>12</sup>.

## **1.5 Modelli di polmone**

Le patologie polmonari rappresentano un importante problema sanitario a livello mondiale, a causa della loro elevata incidenza e letalità, e spesso gli attuali trattamenti non sono sufficienti per ridurre la progressione di alcune patologie, come ad esempio la BPCO o il carcinoma polmonare. Questo rende necessari ulteriori studi per comprendere meglio i

meccanismi alla base di una determinata malattia e sviluppare nuovi approcci terapeutici<sup>8,19</sup>. In questo senso le ricerche hanno portato allo sviluppo di modelli che possano essere utilizzati per studiare meglio le condizioni patologiche, testare farmaci che devono essere somministrati per via inalatoria sottoforma di aerosol, e indagare gli effetti avversi causati dall'inalazione di nanoparticelle (NPs) o molecole potenzialmente tossiche<sup>20</sup>. Le indagini sui processi patologici effettuate direttamente sui pazienti sono limitate, e la maggior parte delle informazioni ottenute derivano da studi effettuati sui polmoni di pazienti deceduti o che sono stati sottoposti a biopsia polmonare nelle fasi avanzate della malattia<sup>17</sup>.

### **1.5.1 Modelli animali**

I modelli animali offrono la possibilità di condurre indagini su sistemi biologici complessi, e possono essere molto utili per effettuare studi di farmacocinetica e farmacodinamica, per determinare la clearance polmonare di sostanze che vengono inalate e gli effetti collaterali a livello sistemico<sup>20,21</sup>. Nonostante gli esperimenti su animali abbiano contribuito in maniera significativa alla comprensione dei processi alla base di determinate patologie, e allo sviluppo di nuove soluzioni terapeutiche in diversi campi, l'utilizzo degli animali nella ricerca è stato recentemente rivalutato dalla comunità scientifica, sia per questioni legate alla loro validità clinica, sia per questioni etiche<sup>22</sup>. Innanzitutto, questi modelli presentano dei limiti legati alle differenze che sussistono tra esseri umani e animali, dal punto di vista delle strutture anatomiche (es. estensione e dimensioni delle vie aeree e degli acini, spessore della barriera alveolo-capillare) e della risposta immunitaria. Queste differenze rappresentano un importante ostacolo allo sviluppo di nuovi farmaci, molti dei quali hanno mostrato una buona efficacia nel modello animale, ma hanno fallito durante i successivi trials clinici<sup>19,20</sup>. Per cui le conclusioni tratte dagli studi su animali spesso non possono essere facilmente traslate in ambito clinico. Inoltre, occorre considerare attentamente la scelta della specie da utilizzare nell'esperimento, in modo che il modello selezionato per un determinato studio risulti adeguato alla questione clinica su cui si sta indagando<sup>22</sup>. Ad esempio, i modelli animali di ARDS dovrebbero essere in grado di riprodurre i meccanismi e i cambiamenti patologici che si verificano negli umani, compresa la fase di risposta infiammatoria acuta e i danni a carico della barriera epiteliale/endoteliale. La maggior parte dei modelli animali esistenti, però, sono adatti a riprodurre solo alcuni aspetti della

patologia<sup>17</sup>. Esistono delle differenze tra le specie animali nella risposta a un danno o lesione polmonare, in particolare nella risposta immunitaria che si attua in seguito all'esposizione ad agenti patogeni (differente azione dei PRR). In generale, gli studi sui primati sono maggiormente rilevanti per gli esseri umani rispetto a quelli effettuati ad esempio sui topi, ma sono anche più complessi da organizzare e più costosi. Alcune specie, inoltre, presentano dei macrofagi polmonari intravascolari (PIM), una popolazione di macrofagi che aderiscono alle cellule endoteliali nei capillari polmonari, e che non sono contenuti nei polmoni degli esseri umani. La presenza dei PIM aumenta la sensibilità della specie ai danni polmonari, fattore che dovrebbe essere preso in considerazione nello sviluppo del modello. Le specie che presentano i PIM, ad esempio, manifestano segni di infiammazione se esposti a dosi anche molto piccole di lipopolisaccaridi (LPS), ovvero endotossine presenti nella membrana esterna dei batteri Gram-negativi, che vengono somministrate per ricavare informazioni sulla risposta infiammatoria che si avrebbe in conseguenza di un'infezione batterica<sup>17</sup>.

Il problema di natura etica è legato alle procedure invasive che possano provocare sofferenza agli animali. L'utilizzo di determinate procedure deve essere ben giustificato e, se necessario, accompagnato da un appropriato uso di anestetici o farmaci tranquillanti; occorre inoltre la presenza di un personale medico veterinario di supporto agli esperimenti. Le indicazioni attuali sono quelle di minimizzare il numero di animali utilizzati, evitare procedure non necessarie e fare in modo che i dati ottenuti da questi esperimenti non vengano sprecati o travisati<sup>22</sup>. Nel 1959 Russell & Burch avevano introdotto il principio delle 3R (*Replacement, Reduction, Refinement*), che fa riferimento proprio alla possibilità di sviluppare dei metodi alternativi all'utilizzo degli animali nella fase di trials preclinici (es. modelli *in vitro* più predittivi), oltre alla necessità di ridurre il numero degli animali e migliorare le loro condizioni di vita durante l'esecuzione delle procedure sperimentali<sup>23</sup>.

### 1.5.2 Modelli *ex vivo*

I modelli *ex vivo* cercano di colmare il divario esistente tra modelli animali e modelli *in vitro*. Il polmone offre principalmente due possibilità per sviluppare modelli *ex vivo*: isolare e perfondere l'intero organo, o parti di esso, per poi effettuare gli studi di interesse; oppure ricavare dall'organo delle fette da coltivare su apposite piastre. Questi tipi di modello, a differenza di quelli *in vitro*, preservano la struttura fisiologica e contengono tutte le

tipologie di cellule. Generalmente, però, hanno una durata limitata (da alcune ore a pochi giorni), e possono presentare problemi di danneggiamento cellulare e nell'apporto di mezzo di coltura e ossigeno<sup>21</sup>.

### 1.5.3 Modelli *in vitro*

I modelli *in vitro* rappresentano delle piattaforme facilmente scalabili su cui realizzare colture cellulari e testare l'efficacia di farmaci o l'effetto di NPs e composti chimici<sup>20</sup>. Questi modelli comportano una riduzione della complessità biologica del sistema, ma ciò consente di effettuare studi mirati in condizioni altamente controllate<sup>21</sup>. Il sistema deve cercare di mimare il più possibile l'ambiente fisiologico e le condizioni presenti *in vivo*. Le strategie utilizzate per replicare la funzionalità del polmone *in vitro* si basano non sulla riproduzione dell'intero organo, ma principalmente su modelli in piccola scala, concentrandosi sulle regioni più rilevanti per lo studio dei disturbi respiratori. Per questo motivo gran parte dei modelli di polmone si focalizzano sulla regione alveolare<sup>19</sup>. Considerando quindi il microambiente dell'alveolo polmonare, le specifiche per ottenere un modello fisiologicamente rilevante sono le seguenti:

- utilizzo di cellule che compongono la barriera alveolo-capillare, ovvero principalmente cellule epiteliali ed endoteliali, coltivate per esempio sulle superfici di una membrana;
- la membrana che funge da substrato per la coltura cellulare deve avere proprietà simili alla membrana basale naturale, in termini di composizione chimica e comportamento biomeccanico;
- presenza di un sistema fluidico che riproduca il flusso del sangue attraverso i capillari alveolari (velocità media circa 1 mm/s, portata 2-5 mL/min) e fornisca un adeguato nutrimento alle cellule, oltre a riprodurre sforzi di taglio fisiologici percepiti dalle cellule endoteliali (circa 1.5 Pa);
- utilizzo di un'interfaccia aria-liquido (ALI), in modo da riprodurre le condizioni che si hanno *in vivo*, dove le cellule epiteliali alveolari sono a contatto con l'aria;
- stimolazione meccanica ciclica (fisiologica o patologica a seconda delle condizioni da mimare), per riprodurre il movimento della barriera durante le fasi della respirazione<sup>20</sup>.

Un modello di barriera alveolo-capillare potrebbe soddisfare anche solo alcuni di questi requisiti, a seconda della complessità del modello, del tipo di studio e dei test che si vogliono effettuare<sup>20</sup>.

Per caratterizzare l'integrità della barriera epiteliale che costituisce il modello (che dipende principalmente dalla corretta formazione di giunzioni strette tra le cellule) si possono misurare dei parametri bioelettrici, come la resistenza elettrica trans-epiteliale (TEER), o anche effettuare studi sulla permeabilità utilizzando molecole opportunamente marcate e con particolari caratteristiche fisico-chimiche (in termini di dimensioni, idrofilicità, ecc.). Barriere epiteliali funzionali in genere mantengono valori di TEER piuttosto alti (> 1000  $\Omega$  cm<sup>2</sup>) e mostrano una bassa permeabilità. Può essere rilevante anche effettuare studi sulla risposta infiammatoria delle cellule: cambiamenti dell'espressione genica, legati a stress ossidativo o alla secrezione di citochine pro-infiammatorie, possono dare informazioni importanti sulla sicurezza delle formulazioni testate, in seguito alla loro interazione con le cellule epiteliali<sup>21</sup>.

### 1.5.3.1 Cellule e colture cellulari

Le cellule rappresentano una componente fondamentale per la realizzazione di un modello *in vitro*. Le tipologie di cellule che si possono utilizzare per modellare l'epitelio alveolare sono:

- Cellule primarie, ottenute da tessuto sano di donatore. Sono cellule differenziate, che presentano una durata limitata (sopravvivono per un numero limitato di duplicazioni), per cui sono meno suscettibili alla perdita di caratteristiche tessuto-specifiche. Sono quindi un'ottima fonte per realizzare modelli fisiologici e studiare gli effetti di farmaci o composti tossici sulle cellule. Tuttavia, possono essere difficili da reperire, e mostrare variabilità a seconda del donatore o dell'esperimento<sup>3,24</sup>. Le principali cellule primarie impiegate per modellare l'epitelio alveolare sono proprio le cellule epiteliali alveolari umane (hAEPc)<sup>21</sup>, ma possono essere usate anche cellule epiteliali bronchiali (NHBE) e delle piccole vie aeree (SAEC)<sup>3</sup>.
- Linee cellulari, ovvero cellule che hanno acquisito l'abilità di proliferare in maniera indefinita, a causa di mutazioni spontanee (cellule tumorali), o di modifiche effettuate artificialmente in laboratorio per rendere le cellule immortalizzate. Sono

ampiamente utilizzate in quanto facili da coltivare e hanno una durata potenzialmente illimitata. Tuttavia, trattandosi di cellule tumorali o geneticamente modificate, sono meno rappresentative dello stato fisiologico<sup>3,24</sup>. La linea cellulare più comunemente usata per modellare la componente epiteliale nei modelli di barriera è la A549, costituita da cellule epiteliali alveolari derivate da adenocarcinoma polmonare<sup>3,21</sup>. Tuttavia, possono essere impiegate anche altre linee, costituite da cellule epiteliali immortalizzate, come le linee TT1 e hAELVi, che mostrano un fenotipo simile agli pneumociti di tipo I. Inoltre, esiste una linea di cellule epiteliali derivate da bronchioli di paziente con adenocarcinoma, la NCI-H441, che viene utilizzata tipicamente per modellare l'epitelio bronchiale, ma possiede in realtà caratteristiche biochimiche e morfologiche comuni sia alle cellule alveolari di tipo II, sia alle cellule di Clara (tipologia presente nei bronchi)<sup>21</sup>.

- Cellule staminali pluripotenti (hPSC), ovvero cellule con un potenziale proliferativo illimitato, e capaci di differenziarsi, sotto opportuni stimoli, in tutti i tipi cellulari che derivano dai tre foglietti embrionali (ectoderma, mesoderma, endoderma), comprese quindi le cellule epiteliali alveolari<sup>20,25</sup>. Poiché l'utilizzo di questa tipologia di cellule implica dei problemi di carattere etico (poiché isolate da embrioni allo stadio di blastocisti), un'alternativa promettente è rappresentata dalle cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC): si tratta di cellule somatiche che vengono riprogrammate per portarle a uno stato indifferenziato, forzando l'espressione di determinati geni legati alla condizione di pluripotenza. Le iPSC possono essere indirizzate a differenziarsi in cellule epiteliali alveolari di tipo I e II, offrendo tra l'altro la possibilità di sviluppare modelli paziente-specifici<sup>25,26</sup>. Tuttavia, nonostante sia stata dimostrata la loro capacità di generare cellule epiteliali, nessuna tipologia di cellule staminali è stata ancora utilizzata per la realizzazione di un modello *in vitro* di polmone<sup>16</sup>.

Per la componente endoteliale dei modelli di barriera, invece, vengono impiegate principalmente cellule primarie. Quelle di gran lunga più utilizzate sono cellule endoteliali derivate da vena ombelicale umana (HUVEC), ma è possibile usare anche cellule endoteliali polmonari umane (HuLEC/HPMEC)<sup>16</sup>.

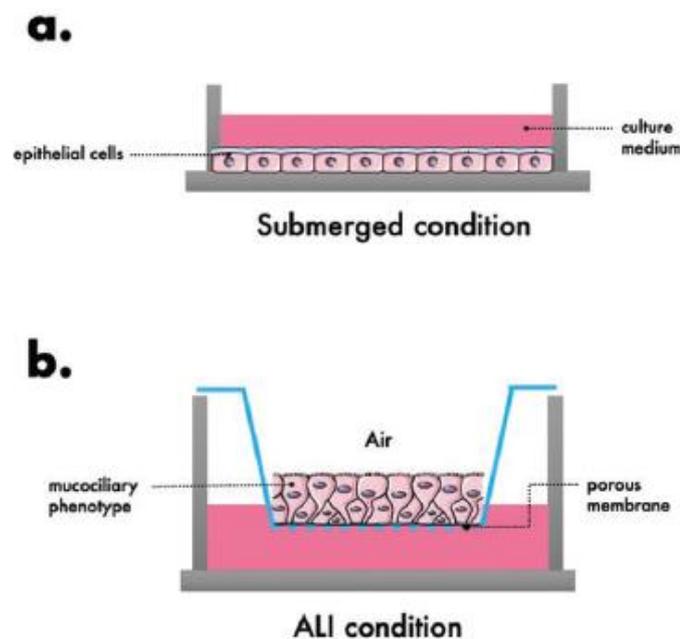
Un accurato modello di barriera alveolo-capillare dovrebbe essere basato su co-culture di differenti tipi cellulari, che includano ad esempio, oltre a cellule epiteliali ed endoteliali, anche fibroblasti polmonari e cellule immunitarie, come macrofagi o cellule

dendritiche<sup>20,21</sup>. La differenza tra mono-coltura e co-coltura si riflette anche sulle proprietà della barriera, che sono importanti per valutare correttamente l'assorbimento e il trasporto di NPs, farmaci o altre sostanze<sup>21</sup>. Ad esempio, Blank et al. Hanno mostrato come una co-coltura basata su cellule epiteliali, macrofagi e cellule dendritiche possa favorire l'espressione di proteine che formano giunzioni strette e giunzioni aderenti, per cui la presenza di cellule immunitarie contribuisce a preservare l'integrità della barriera epiteliale<sup>27</sup>.

Per la coltura delle cellule possono essere adottati diversi sistemi:

- Colture bidimensionali (2D), in cui le cellule vengono fatte aderire su superfici piate, tipicamente delle piastre in vetro o polistirene, che fungono da supporto per la coltura statica delle cellule. Si forma quindi un monostrato uniforme, in cui tutte le cellule hanno accesso alla stessa quantità di nutrienti e fattori di crescita presenti nel mezzo di coltura<sup>28</sup>. Anche se le colture 2D sono ampiamente utilizzate per la loro semplicità e il costo ridotto, non sono in grado di ricreare le condizioni tipiche dell'ambiente fisiologico, in quanto non è presente un'interazione tra le cellule e la loro matrice, che è fondamentale per regolare la crescita, proliferazione e funzionalità cellulare<sup>29</sup>. Le piastre da coltura sono substrati estremamente rigidi (> 1 Gpa) in confronto alla ECM del tessuto naturale, le cui proprietà meccaniche influenzano il fenotipo cellulare<sup>30</sup>. Per cui le cellule, non essendo coltivate in un ambiente simil-fisiologico, tendono anche a de-differenziarsi, perdendo le loro funzioni specifiche<sup>3</sup>. Le cellule epiteliali alveolari coltivate in queste condizioni tendono a non formare giunzioni funzionali, e mostrano bassi valori di TEER. Inoltre, anche la loro risposta immunitaria viene influenzata, con una maggiore sensibilità all'azione degli agenti patogeni, e con il distacco di cellule dalla piastra di coltura<sup>3,31</sup>.
- Colture 2.5D, che in genere fanno uso di una membrana sottile porosa come supporto per le cellule (le cui caratteristiche verranno meglio descritte nel paragrafo successivo). In questa tipologia di colture, le cellule sono coltivate sulla superficie del materiale di supporto, che influenza il comportamento cellulare, ma non vengono incapsulate all'interno della matrice<sup>32</sup>. Fanno parte di questa categoria anche le colture in inserti Transwell<sup>®</sup>, che sono dei supporti permeabili, dotati di una membrana microporosa su cui è possibile coltivare le cellule. L'inserto è progettato in modo da mantenere la membrana circa 1 mm al di sopra del fondo del

pozzetto di coltura, e consentire l'accesso a entrambi i compartimenti ottenuti ai due lati della membrana<sup>33</sup>. I sistemi di coltura in Transwell® si pongono ad un livello intermedio tra le colture bidimensionali e tridimensionali. Infatti, nonostante si tratti sempre di colture (o co-colture) monostrato, questi sistemi sono in grado di riprodurre processi cellulari più complessi, e inoltre permettono di coltivare le cellule non solo in condizioni di coltura completamente sommersa (ovvero esposte al mezzo di coltura su entrambi i lati, Fig. 5a), ma anche in condizioni ALI (Fig. 5b), caratteristica che non è possibile avere nelle colture 2D, ma che invece contraddistingue molti modelli tridimensionali<sup>30</sup>. L'interfaccia aria-liquido è più rappresentativa delle condizioni fisiologiche, in quanto riproduce più fedelmente le funzioni della barriera alveolo-capillare, favorisce la polarizzazione delle cellule epiteliali (ovvero una differenziazione nella struttura e nella funzione delle regioni apicale e basale delle cellule, che distribuiscono in modo asimmetrico gli elementi del citoscheletro e del sistema membrana<sup>34</sup>) e rende il loro fenotipo più simile a quello fisiologico<sup>3,8</sup>.



**Figura 5:** a) Condizioni di coltura sommersa 2D; b) Coltura in condizioni ALI mediante inserto Transwell®<sup>8</sup>.

Questo tipo di coltura è stato utilizzato nello studio di Paskan et al., i quali hanno sviluppato un modello *in vitro* basato su cellule endoteliali ed epiteliali polmonari, coltivate sulle due superfici di una membrana porosa in poli (trimetilene carbonato) (PTMC), alloggiata su un inserto Transwell®. Coltivando le cellule in condizioni ALI, si è osservata un'elevata espressione di proteine responsabili della formazione di giunzioni aderenti tra le cellule epiteliali. Inoltre, gli studi effettuati su co-colture dei due tipi di cellule hanno mostrato una più elevata vitalità cellulare e una migliore funzionalità della barriera rispetto alle mono-colture<sup>35</sup>.

- Colture tridimensionali (3D), il cui obiettivo è quello di ricreare una struttura che imiti la ECM del tessuto naturale<sup>29</sup>. Questi sistemi di coltura sono quindi molto più rappresentativi della situazione *in vivo*, in quanto permettono di riprodurre le interazioni cellula-cellula e cellula-ECM presenti nell'ambiente fisiologico<sup>3,29</sup>. La presenza di una struttura 3D influenza la formazione di giunzioni strette tra le cellule epiteliali, grazie all'espressione di proteine che formano questi complessi, e permette di avere una risposta infiammatoria molto più fisiologica, con produzione sia di citochine pro-infiammatorie, sia antinfiammatorie<sup>3,31</sup>.

Nei modelli 3D le cellule possono essere coltivate con l'aiuto di scaffold, ovvero strutture tridimensionali che offrono un ambiente favorevole all'adesione e proliferazione cellulare, e alla maturazione del costrutto, oppure senza l'impiego di materiali di supporto<sup>29</sup>. Nel primo caso, per quanto riguarda i modelli di barriera alveolo-capillare, si possono usare ad esempio degli idrogeli<sup>3</sup>, ovvero strutture reticolate formate da polimeri altamente idrofilici, in grado di assorbire un'elevata quantità d'acqua o fluidi biologici, caratteristica che conferisce a queste strutture proprietà simili alla ECM dei tessuti molli naturali<sup>29</sup>. Con gli idrogeli si può quindi riprodurre anche lo spazio interstiziale presente nella regione alveolare, incapsulando fibroblasti all'interno di una struttura a base di collagene, e coltivando cellule epiteliali sulla superficie dell'idrogelo<sup>36</sup>. Nel caso in cui il modello 3D non preveda l'utilizzo di scaffold, invece, le cellule possono essere coltivate sotto forma di sferoidi, ovvero aggregati cellulari di dimensione variabile, che si auto-assemblano senza l'impiego di materiali di supporto<sup>3,29</sup>. Negli sferoidi esiste un gradiente di diffusione di nutrienti e ossigeno, che diminuisce procedendo verso l'interno: il tasso di proliferazione cellulare più elevato, infatti, si ha in superficie, mentre nella zona più interna è presente un core di cellule necrotiche, che non riescono ad avere accesso ai nutrienti e sono meno sensibili ai trattamenti

farmacologici <sup>28,29</sup>. Si ritiene che, grazie a queste caratteristiche, gli sferoidi riproducano in maniera efficace il comportamento *in vivo* dei tumori, per cui questi modelli suscitano particolare interesse nell'ambito della ricerca oncologica, per ottenere informazioni più accurate sul microambiente tumorale, e per le procedure di screening di potenziali agenti terapeutici antitumorali <sup>29,37</sup>.

Un altro aspetto che caratterizza le colture cellulari riguarda la distinzione tra coltura statica e dinamica. In una coltura statica, il mezzo deve essere sostituito manualmente a intervalli regolari, poiché si esauriscono i nutrienti e si accumulano le sostanze di scarto. Questa procedura provoca cambiamenti repentini nelle condizioni di coltura, per cui le cellule si trovano in un ambiente diverso da quello fisiologico <sup>38</sup>. Inoltre, nelle colture statiche 3D, la diffusione non è sufficiente a garantire un adeguato apporto di nutrienti e ossigeno, e rimozione dei metaboliti, nelle zone più interne del costrutto. In una coltura dinamica, che si può realizzare mediante l'utilizzo di un bioreattore, è possibile ottenere una distribuzione uniforme di nutrienti e ossigeno. Inoltre, le cellule sono mantenute in un ambiente stabile, più simile a quello *in vivo*, e sottoposte ad opportuni stimoli fisici e biochimici <sup>39</sup>. Le caratteristiche e i vantaggi offerti dai bioreattori rispetto ai metodi di coltura statica verranno approfonditi in seguito.

### 1.5.3.2 Caratteristiche della membrana di supporto

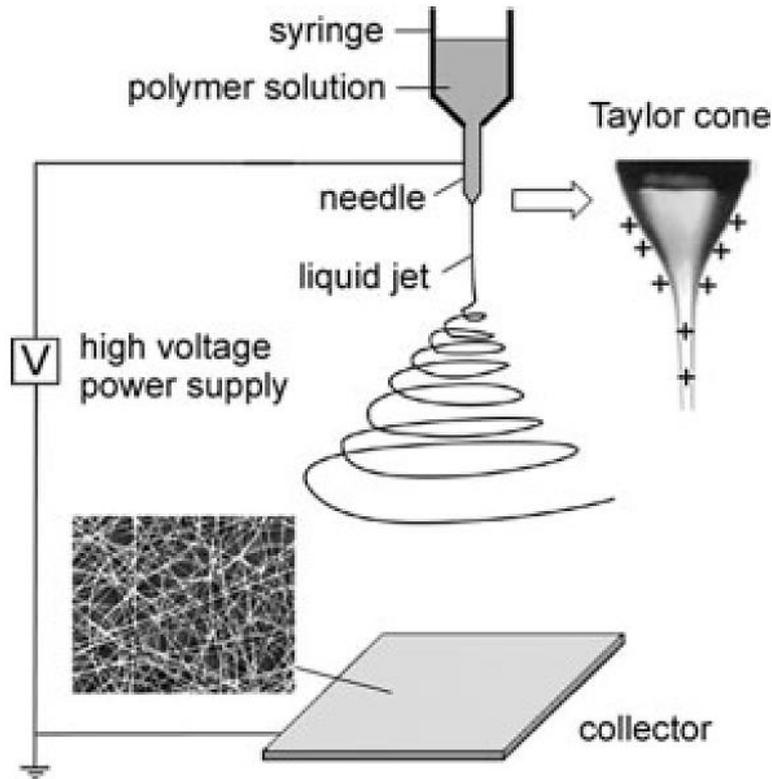
I dispositivi progettati per modellare la barriera alveolo-capillare possono essere integrati con sistemi di stimolazione meccanica che permettano di simulare il meccanismo fisiologico della respirazione. Al fine di riprodurre correttamente questo tipo di stimolazione, è necessario progettare, come supporto per le cellule, delle membrane biomimetiche, che abbiano proprietà simili a quelle della membrana basale alveolare. In questo senso, occorre considerare gli aspetti legati alle proprietà meccaniche, porosità, permeabilità e biocompatibilità <sup>8</sup>. La membrana deve essere sufficientemente rigida per svolgere la sua funzione di supporto alle cellule, e allo stesso tempo abbastanza elastica per poter sopportare deformazioni cicliche (fisiologiche e patologiche) senza andare incontro a fenomeni di deformazione plastica o rottura <sup>8,40</sup>. Inoltre, deve avere un elevato grado di bagnabilità (angolo di contatto  $< 70^\circ$ ) per consentire un'adeguata adesione e crescita cellulare. La permeabilità della membrana è legata alla porosità e all'interconnessione dei pori, che devono essere tali da permettere il trasporto di nutrienti e biomolecole tra il

compartimento apicale e quello basale, ma allo stesso tempo evitare il passaggio non voluto di cellule attraverso la membrana. A tal proposito, la dimensione ideale dei pori dovrebbe essere di circa 3  $\mu\text{m}$ . Un altro fattore importante per mimare le proprietà della barriera alveolo-capillare è lo spessore in corrispondenza della regione deputata allo scambio gassoso, che nel tessuto naturale è di circa 0.6  $\mu\text{m}$ <sup>8</sup>. Tuttavia, dal momento che membrane di questo spessore sono molto difficili da maneggiare, la maggior parte delle membrane artificiali attualmente disponibili in commercio hanno spessori di circa 10-20  $\mu\text{m}$ , che ovviamente provocano una maggiore resistenza allo scambio di gas e macromolecole<sup>8,19</sup>. I polimeri sono la classe di materiali più adatta alla realizzazione di membrane che soddisfino i requisiti richiesti, grazie alla diversità nei gruppi chimici che presentano, i quali conferiscono proprietà uniche e controllabili. Attualmente, uno dei materiali più utilizzati è il polidimetilsilossano (PDMS), grazie alle sue buone proprietà meccaniche (pur essendo un substrato più rigido rispetto alla membrana naturale), permeabilità ai gas, trasparenza ottica, basso costo e facilità di utilizzo. Tuttavia, il PDMS è un materiale idrofobico, per cui è necessario funzionalizzare la membrana (ad esempio tramite rivestimento con proteine della ECM, come collagene o fibronectina) per aumentare la bagnabilità e l'adesione cellulare<sup>8</sup>. Realizzare uno strato confluyente di cellule epiteliali su membrane in PDMS funzionalizzate rimane comunque un aspetto non banale, a causa dei fenomeni di aggregazione e/o distacco di cellule dalla superficie che possono avvenire durante la fase di coltura e sotto stimolazione meccanica. Inoltre, l'assorbimento non voluto di piccole molecole idrofobiche sulla superficie del PDMS può influenzare le risposte cellulari<sup>8,40</sup>. È possibile realizzare anche membrane in policaprolattone (PCL), polietilentereftalato (PET), policarbonato(uretano) (PCU), polidiossano (PDS) o acido poli(lattico-co-glicolico) (PLGA), anch'esse con buone proprietà elastiche ma limitazioni per quanto riguarda l'adesione e crescita cellulare, a causa della natura idrofobica di questi materiali. In alternativa, è possibile immobilizzare su questi polimeri sintetici delle sequenze peptidiche, derivate da proteine della ECM e responsabili dell'adesione di determinati tipi cellulari (es. sequenze RGD e IKVAV), in modo da ottenere membrane sintetiche bioattivate e selettive. I polimeri naturali mostrano invece proprietà migliori dal punto di vista della biocompatibilità e dell'interazione cellule-matrice, ma le loro scarse proprietà meccaniche e la tendenza alla degradazione fanno sì che le membrane composte unicamente da questi materiali non siano adatte per la coltura cellulare a lungo termine in condizioni di stimolazione meccanica. È possibile invece realizzare dei compositi di polimeri sintetici e

naturali, per sfruttare le caratteristiche di entrambi (bioattività data dai polimeri naturali e proprietà meccaniche date dai polimeri sintetici)<sup>8</sup>.

### 1.5.3.3 Fabbricazione delle membrane

Le tecniche più utilizzate per la fabbricazione delle membrane artificiali sono il *solvent casting/particulate leaching* (che permette di ottenere strutture con una certa porosità sfruttando particelle di materiale porogeno, aggiunte alla soluzione polimerica e dissolte in una fase successiva all'evaporazione del solvente), la separazione di fase indotta termicamente (TIPS, in cui un abbassamento della temperatura porta alla formazione di una fase ricca di polimero e una povera di polimero, per poi ottenere una struttura porosa in seguito all'evaporazione del solvente) e l'*electrospinning*, un processo che permette di ottenere membrane nanofibrose a partire da una soluzione polimerica, sfruttando l'azione di un campo elettrico<sup>8,41</sup>. In particolare, l'*electrospinning* rappresenta una tecnica semplice e poco costosa, che consente il controllo su forma, spessore, architettura e caratteristiche biofisiche dello scaffold da ottenere. Con questa tecnica è possibile fabbricare strutture porose con un elevato rapporto superficie/volume, e mimare le caratteristiche della ECM naturale<sup>8</sup>. Il tipico setup dell'*electrospinning* è composto da una siringa contenente la soluzione polimerica, un ago per l'estrusione, una sorgente di alta tensione e un collettore metallico su cui vengono depositate le fibre (Fig. 6). Mediante l'utilizzo di una pompa a siringa, viene generato il flusso di soluzione polimerica, e applicando una differenza di potenziale (fino a 30 kV) tra l'ugello di estrusione e il collettore, la goccia di soluzione che si trova sulla punta dell'ago assume una forma a cono (cono di Taylor) a causa delle forze elettrostatiche. Quando il campo elettrico raggiunge un'intensità tale per cui le forze di repulsione elettrostatica vincono la tensione superficiale della soluzione polimerica, si forma un getto di soluzione che, nel suo percorso verso il collettore, inizialmente segue una traiettoria lineare, per poi entrare in una zona di instabilità in cui assume una traiettoria a spirale divergente e può suddividersi in getti più piccoli. Durante il percorso il solvente evapora, portando alla formazione di una matrice di fibre polimeriche che si depositano sul collettore<sup>42</sup>.



*Figura 6: Illustrazione schematica del setup tipico dell'electrospinning<sup>43</sup>.*

Nonostante la semplicità del processo, ci sono tanti parametri, di processo e di sistema, che influenzano significativamente il diametro e la struttura delle fibre prodotte<sup>42,44</sup>. Tra i parametri di processo che devono essere ottimizzati, i più importanti sono:

- Differenza di potenziale applicata, il cui aumento dovrebbe provocare un maggiore stiramento del getto di soluzione, portando alla formazione di fibre più sottili. Tuttavia, diversi studi hanno mostrato come il diametro delle fibre diminuisca nella fase iniziale, per poi aumentare in seguito a un ulteriore incremento della tensione. Questo può essere dovuto al fatto che una differenza di potenziale più elevata può accelerare il getto verso il collettore, riducendo il tempo necessario a stirarlo prima della deposizione<sup>44</sup>.
- Distanza tra la punta dell'ago e il collettore, che tipicamente è compresa nel range 10-15 cm, in modo da garantire un tempo di volo sufficiente a far evaporare il solvente. Aumentare questa distanza può portare a una diminuzione del diametro delle fibre, a causa di un maggiore stiramento del getto. Tuttavia, oltre una certa

distanza, il diametro può aumentare a causa di un indebolimento del campo elettrico<sup>44</sup>.

- Portata volumetrica, il cui aumento porta alla formazione di fibre di maggiore diametro, ma anche alla presenza di difetti (“beads”) e, se il valore supera un certo limite, può provocare il gocciolamento della soluzione dalla punta dell’ago e la deposizione di fibre a forma di nastro, ancora cariche di solvente<sup>44</sup>.

Oltre questi parametri di processo, anche le proprietà della soluzione polimerica e i parametri ambientali hanno un effetto importante sulla produzione e morfologia delle fibre. Un aumento della concentrazione della soluzione (maggiore viscosità), ad esempio, porta alla formazione di fibre di maggiore diametro. Inoltre, soluzioni più concentrate permettono di ottenere fibre più uniformi con meno difetti superficiali<sup>42,44</sup>. Un miglioramento nella qualità delle fibre prodotte si può riscontrare anche aumentando la conduttività della soluzione, mentre il diametro in questo caso diminuisce. Anche la volatilità del solvente deve essere compresa in un range ottimale: l’utilizzo di un solvente poco volatile può portare a una non completa evaporazione dello stesso, mentre al contrario solventi con un’elevata volatilità possono dare origine a una filatura intermittente, a causa della solidificazione del polimero sulla punta dell’ugello di estrusione. Per quanto riguarda i parametri ambientali, una variazione del livello di umidità porta alla formazione di fibre più spesse, mentre un aumento di temperatura (che a sua volta provoca una più rapida evaporazione del solvente, e una riduzione della viscosità della soluzione) consente di ottenere fibre di diametro inferiore<sup>44</sup>.

È possibile anche controllare la deposizione delle fibre, ad esempio utilizzando un collettore rotante, oppure ad anelli paralleli, che permetta di avere le fibre non disposte in maniera casuale (come avviene con un collettore statico piano), ma allineate lungo una certa direzione. Questo può essere utile quando, coltivando delle cellule sullo scaffold ottenuto, si vuole favorire la loro crescita lungo una determinata direzione. Anche i collettori statici possono essere modificati per poter controllare l’orientazione delle fibre: ad esempio, è possibile introdurre un campo elettrico esterno mediante degli elettrodi ausiliari, in modo da indirizzare il getto e depositare le fibre allineate<sup>44</sup>.

### 1.5.3.4 Bioreattori

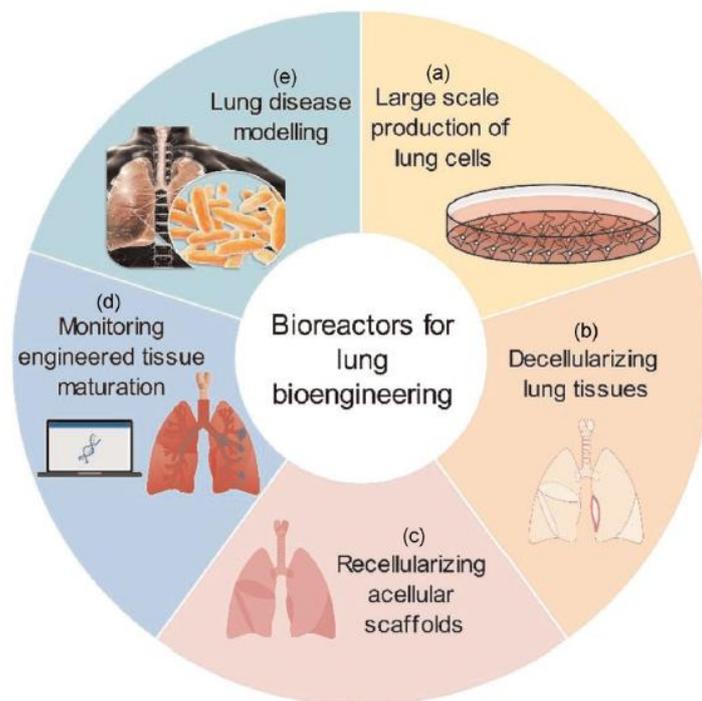
I bioreattori sono sistemi di coltura dinamica in cui l'applicazione di opportuni stimoli biochimici e fisici promuove lo sviluppo dei processi biologici *in vitro*, in condizioni operative e ambientali strettamente monitorate e controllate (ad esempio in termini di pH, temperatura, pressione, sforzi di taglio, apporto di nutrienti)<sup>45,46</sup>. Il sistema, oltre alla camera di coltura, può essere equipaggiato di altre parti, come le pompe che consentono la circolazione del mezzo di coltura, i reservoir per il mezzo fresco ed esausto (in modo da avere un continuo ricambio del mezzo), sistemi di monitoraggio dei parametri fisici e chimici e delle strategie di controllo (specialmente quando è prevista l'applicazione di uno stimolo meccanico)<sup>47</sup>.

Le componenti di un bioreattore devono essere realizzate con materiali biocompatibili e facilmente sterilizzabili, caratterizzate da un design semplice che consenta un rapido assemblaggio e disassemblaggio del bioreattore. I sensori per il monitoraggio dei parametri, come pH, temperatura e concentrazione di ossigeno, devono essere altamente efficienti e affidabili, mentre i sistemi di attuazione meccanica (ove richiesti) devono essere abbastanza sensibili da consentire l'applicazione di forze anche molto piccole. La tipologia e l'intensità dello stimolo meccanico dipendono dal tipo di cellule e dall'applicazione finale del costruito, in quanto questi segnali vanno ad influenzare l'attività e la funzione cellulare. In ogni caso, le forze applicate (compresi gli sforzi di taglio indotti dal flusso del mezzo di coltura) devono essere tali da non provocare effetti dannosi sulle cellule e sulla funzionalità del tessuto. A questo proposito, i modelli computazionali possono essere molto utili per prevedere l'effetto di determinati stimoli e ottimizzare i valori dei parametri<sup>39</sup>.

I bioreattori presentano numerosi vantaggi rispetto ai metodi di coltura statica, tra cui un efficiente trasporto di massa (apporto di nutrienti e ossigeno, e rimozione delle sostanze di scarto), la regolazione degli sforzi di taglio all'interno della camera di coltura, il mantenimento di livelli costanti di pH e pressioni parziali dei gas, e l'automatizzazione del processo<sup>16,47</sup>. La possibilità di avere un sistema automatizzato consente di standardizzare le condizioni di coltura in modo da ottenere risultati riproducibili in termini di crescita e funzionalità del tessuto<sup>39</sup>.

I bioreattori possono essere utilizzati per scopi differenti, ciascuno dei quali prevede lo sviluppo di soluzioni tecnologiche specifiche. Limitatamente alle applicazioni legate al polmone, sono stati sviluppati bioreattori per la produzione di cellule polmonari su larga scala (sia per espansione cellulare, sia per stimolare la differenziazione di cellule staminali

in cellule caratteristiche del polmone), bioreattori per decellularizzazione e ricellularizzazione di tessuto polmonare, sistemi per la valutazione delle condizioni di coltura e per la maturazione di tessuti polmonari ingegnerizzati (per esempio allo scopo di stabilire il momento adatto per effettuare un trapianto) e, non ultimo, bioreattori per modelli *in vitro*, in grado quindi di mimare le condizioni *in vivo* e ricreare l'ambiente adatto ad esempio per lo studio di patologie polmonari o per effettuare screening di farmaci. È possibile anche applicare in maniera controllata specifiche sollecitazioni meccaniche e studiare l'effetto fisiopatologico di questi stimoli sul costruito <sup>46</sup>. In Figura 7 vengono schematizzate le principali applicazioni dei bioreattori nell'ingegneria del polmone. Gran parte dei modelli *in vitro* più avanzati che sono stati sviluppati per studiare meglio la barriera alveolo-capillare, e che verranno discussi più nel dettaglio nel paragrafo successivo, prevedono l'utilizzo di un bioreattore.

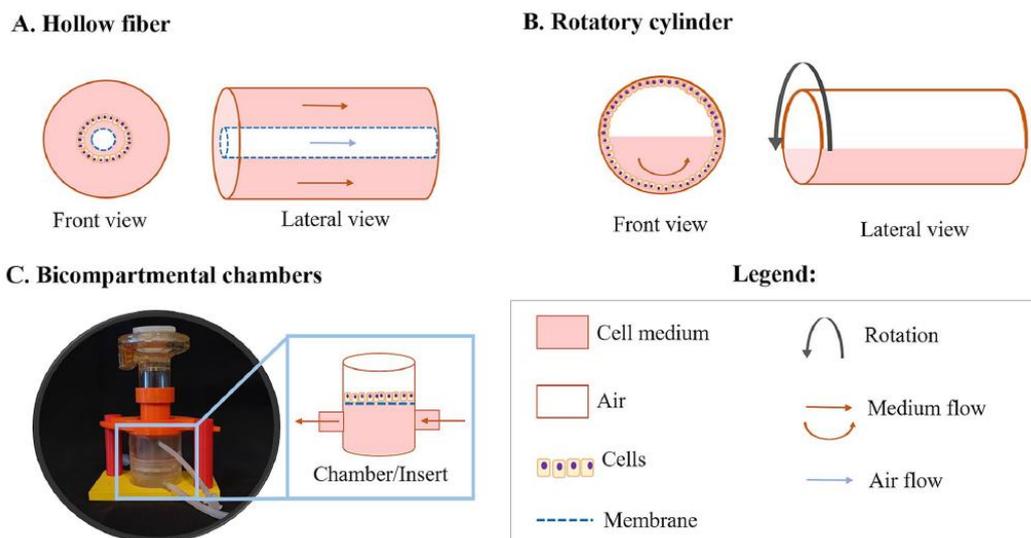


**Figura 7:** Rappresentazione schematica delle applicazioni dei bioreattori nell'ingegneria del polmone<sup>46</sup>.

### 1.5.3.5 Modelli avanzati di barriera alveolo-capillare

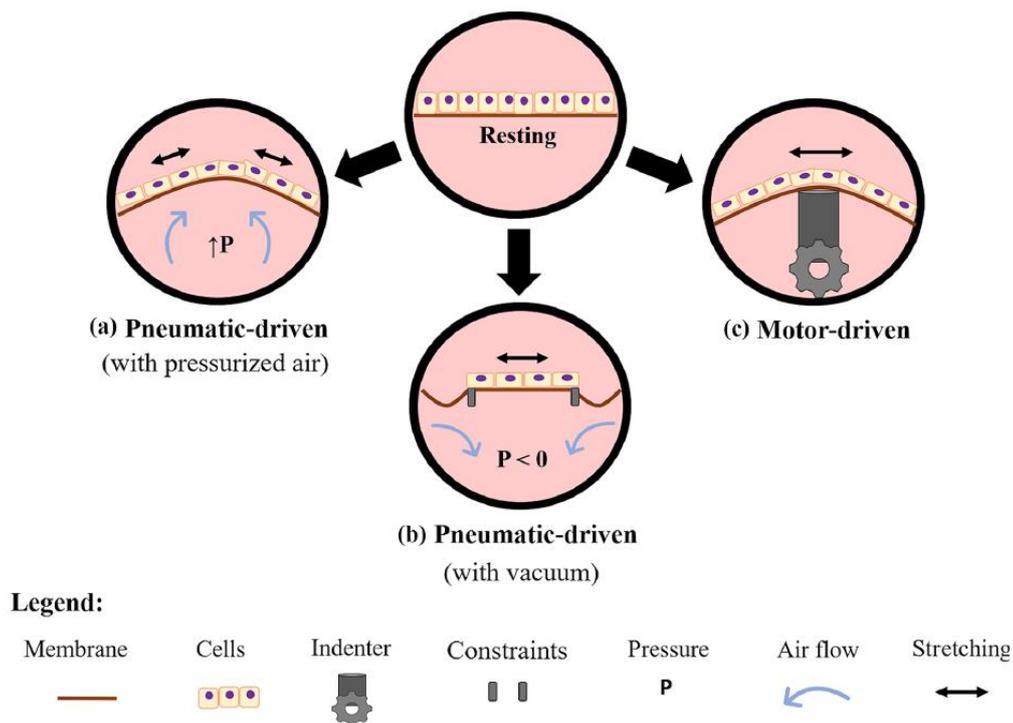
Accanto alle cellule, la scelta di un appropriato setup sperimentale è un aspetto cruciale nella realizzazione di un modello *in vitro* avanzato, che riproduca quindi un ambiente complesso e sia in grado di mimare meglio le caratteristiche e il microambiente del tessuto nativo. Esistono diverse soluzioni che sono state adottate per riprodurre uno o più aspetti che caratterizzano la barriera alveolo-capillare, tra cui:

- Sistemi per la coltura dinamica in condizioni ALI, che riproducano gli sforzi di taglio e la diffusione di nutrienti e ossigeno, grazie al flusso del mezzo di coltura. A tale scopo sono stati utilizzati bioreattori con differenti configurazioni: bioreattori a fibra cava (Fig. 8a), in cui aria e mezzo di coltura vengono fatti fluire rispettivamente all'interno della fibra e nella zona circostante; bioreattori a parete rotante (Fig. 8b), in cui le cellule si trovano alternativamente a contatto con l'aria e col mezzo liquido, mentre il sistema ruota (non è una soluzione molto rappresentativa della condizione *in vivo*); bioreattori bi-compartmentali (Fig. 8c), dotati di una membrana porosa che separa due compartimenti, quello apicale (contenente aria) e quello basale (contenente mezzo di coltura), e un sistema di tubi e pompe per consentire il passaggio di aria e liquido nelle due camere<sup>8,20</sup>.



**Figura 8:** Configurazioni di bioreattori per coltura in condizioni ALI: **a)** bioreattore a fibra cava; **b)** bioreattore a parete rotante; **c)** bioreattore bi-compartmentale<sup>20</sup>.

- Sistemi che combinino la coltura dinamica in condizioni ALI con l'esposizione a particelle di aerosol, che attraverso il compartimento alveolare vengono depositate direttamente sullo strato di cellule epiteliali. Questi sistemi sono utili per testare l'efficacia di potenziali farmaci o effettuare studi sulla tossicità di determinate sostanze<sup>8,20</sup>. L'esposizione può avvenire utilizzando approcci diversi, per esempio mediante nebulizzatori o microspray commerciali, e alcuni sistemi prevedono anche l'applicazione di un campo elettrico, per avere un miglior controllo sulla precipitazione delle particelle, una maggiore efficienza di deposizione e una distribuzione più uniforme sullo strato di cellule esposte. Esistono anche sistemi che simulano l'inalazione del fumo di tabacco e ne indagano gli effetti sul tessuto alveolare<sup>20</sup>.
- Dispositivi in grado di riprodurre la deformazione meccanica che subisce la barriera alveolare durante la respirazione. *In vivo* si osservano deformazioni lungo direzioni diverse, che contribuiscono a influenzare il comportamento cellulare. Tuttavia, non è facile replicare questo fenomeno *in vitro*: molti modelli, pur applicando deformazioni multi-assiali, non sono in grado di riprodurre una curvatura fisiologica della membrana. Inoltre, i meccanismi di deformazione *in vivo* e *in vitro* sono differenti: mentre negli alveoli le forze generate dai muscoli vengono trasmesse alle cellule epiteliali attraverso la ECM, nei modelli *in vitro* le membrane vengono deformate mediante l'impiego di sistemi pneumatici o a motore, che possono portare ad una distribuzione delle tensioni non fisiologica. I sistemi a motore sono dotati di indentatori per l'attuazione meccanica (Fig. 9c), mentre quelli pneumatici deformano la membrana tramite l'applicazione di una sovrappressione (sistemi ad aria compressa, dotati di regolatori per il controllo della pressione dell'aria, Fig. 9a) o sottopressione (camere in cui viene fatto il vuoto, Fig. 9b)<sup>20</sup>. Per ribadire l'importanza della sollecitazione meccanica sul comportamento delle cellule e quindi sulle caratteristiche del tessuto polmonare, nello studio di Xie et al. è emerso come una stimolazione meccanica di elevata intensità (con deformazione del 15-20%) possa favorire il processo di fibrosi polmonare, influenzando la struttura e il comportamento viscoelastico dei fibroblasti, e provocando un significativo aumento nei livelli di collagene e del fattore di crescita TGF- $\beta$ 1<sup>48</sup>.



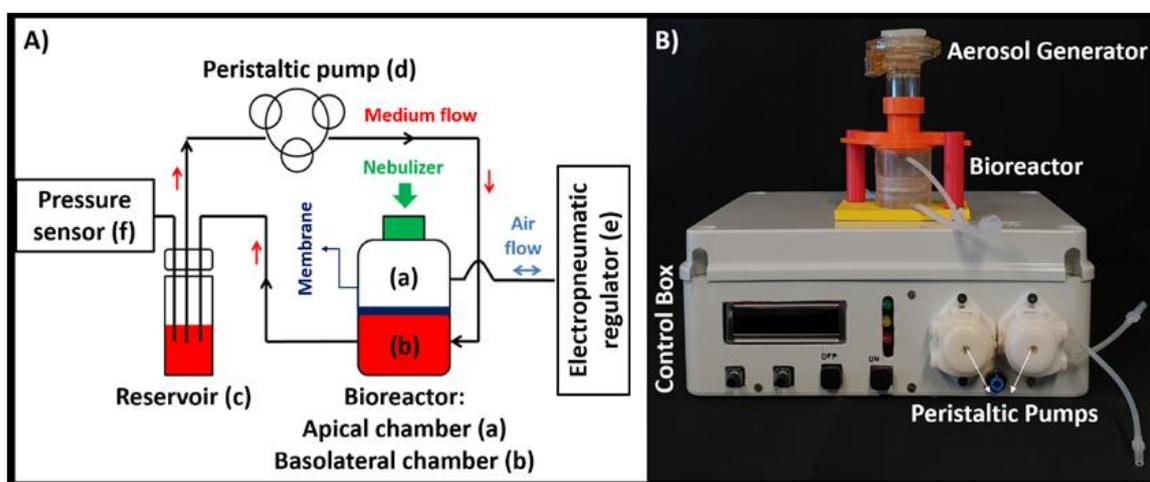
**Figura 9:** Schema dei principali meccanismi per la deformazione della membrana di supporto nei modelli di barriera alveolo-capillare: **a)** sistemi pneumatici che applicano una sovrappressione; **b)** sistemi pneumatici che applicano una sottopressione; **c)** sistemi a motore dotati di indentatore<sup>20</sup>.

Ad oggi sono pochi i sistemi che prevedono la presenza contemporanea di stimolazione meccanica, coltura dinamica in condizioni ALI ed esposizione ad aerosol. Per cui l'obiettivo nello sviluppo dei modelli di barriera è quello di realizzare dispositivi che integrino tutti questi aspetti. Inoltre, bisogna sottolineare come la direzione da prendere non dipenda solamente dalle nuove tecnologie che si hanno a disposizione, ma anche dalle motivazioni per cui occorre realizzare un certo modello. Questo aspetto è apparso ancora più chiaro in seguito alla pandemia da coronavirus (COVID-19), che ha messo in evidenza l'importanza di avere a disposizione modelli *ad hoc* affidabili per lo studio sistematico di determinate patologie respiratorie<sup>20</sup>.

Gli attuali modelli a disposizione vanno a ricreare solo piccole componenti dell'interfaccia alveolo-capillare, e non riproducono fedelmente l'architettura 3D delle vie aeree inferiori. Per cui le risposte cellulari, all'interno di questi sistemi, saranno comunque differenti da quelle che si osservano nel tessuto naturale, dove il comportamento delle cellule dipende anche dall'interconnessione delle diverse regioni del polmone. Quindi, lo sviluppo di

modelli *in vitro* più complessi, che contengano ad esempio numerosi alveoli interconnessi con i tratti bronchiali e i vasi sanguigni, sarebbe molto utile per avere un modello ancor più biomimetico, e per capire come le sollecitazioni meccaniche e lo scorrimento dei fluidi influenzino le risposte cellulari e l'integrità della membrana in un ambiente molto più realistico. L'utilizzo della ECM del polmone naturale per lo sviluppo di questi modelli complessi potrebbe essere una strategia efficace, dal momento che essa possiede già l'adeguata struttura 3D, proprietà meccaniche, composizione chimica e organizzazione del tessuto naturale<sup>16</sup>.

Tra i dispositivi che sono stati sviluppati per riprodurre l'interfaccia alveolo-capillare, un esempio è rappresentato dal bioreattore MALI (*Moving Air-Liquid Interface*), costituito da due camere separate da una membrana in PCU, sulla cui superficie superiore vengono coltivate cellule epiteliali A549. Nella camera basale viene fatto fluire mezzo di coltura, mentre quella apicale, contenente aria, si interfaccia con un nebulizzatore per la deposizione di aerosol, per simulare ad esempio il rilascio di farmaco che avviene durante una terapia inalatoria. Il sistema prevede anche un regolatore elettropneumatico che permette di variare ciclicamente la pressione tra 0 e 7 kPa, in modo da flettere la membrana e riprodurre i livelli di deformazione fisiologica e patologica degli alveoli (Fig. 10a-b)<sup>49</sup>.



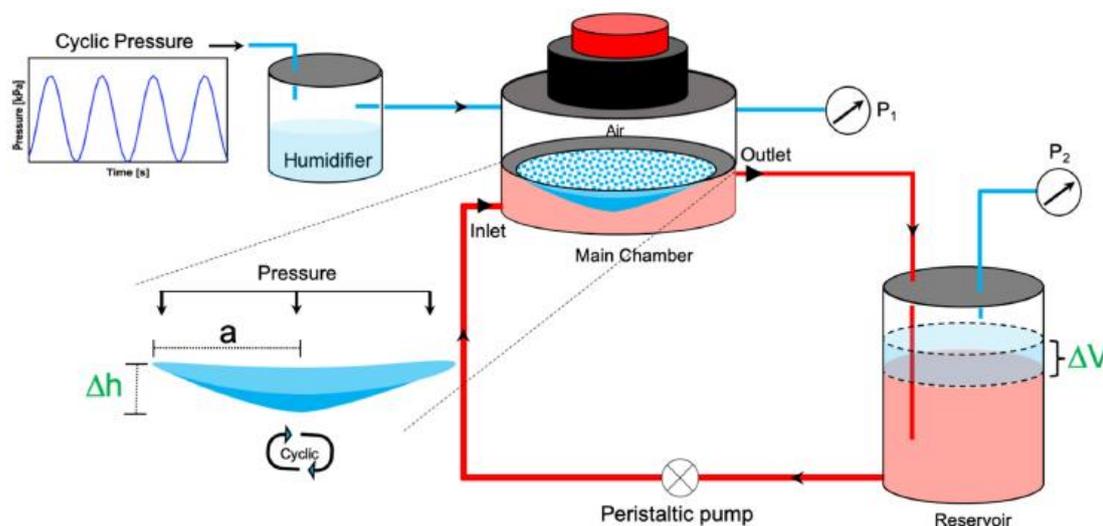
**Figura 10:** a) Rappresentazione schematica del setup e dei componenti del sistema MALI; b) fotografia del sistema<sup>49</sup>.

Durante l'applicazione dello stimolo, un sensore rileva la variazione di pressione nel reservoir, che è legata alla variazione di volume del mezzo in camera basale, e quindi alla deformazione subita dalla membrana (non essendoci passaggio di liquido attraverso la membrana stessa). I risultati dello studio hanno mostrato come la sollecitazione meccanica ciclica non alteri l'elasticità della membrana e il sistema non abbia effetti dannosi sulle cellule. Tuttavia, la membrana è più spessa della lamina basale fisiologica, per cui le cellule hanno avuto modo di penetrare nella struttura porosa formando degli aggregati al suo interno, invece di depositarsi solamente sulla superficie. Inoltre, lo spessore elevato può interferire con i processi di trasporto transmembrana<sup>49</sup>.

Per questo motivo, gli autori hanno recentemente sviluppato una membrana ibrida con caratteristiche meccaniche più adatte all'utilizzo in questo sistema. Si tratta di una membrana realizzata in PCL e gelatina, che ha uno spessore inferiore a 5  $\mu\text{m}$  (molto più vicino a quello della barriera alveolo-capillare) e la caratteristica di essere bifasica, ovvero con proprietà variabili a seconda della fase di lavoro: inizialmente i pori sono riempiti dalla gelatina, creando un substrato più rigido, non poroso e bagnabile, ideale per l'adesione delle cellule e la loro crescita in condizioni di coltura sommersa (i pori chiusi evitano la migrazione di cellule attraverso la membrana), fino a formare un layer compatto sulla superficie. Dopodiché la gelatina viene disciolta dal mezzo di coltura, trasformando la membrana in un substrato poroso, permeabile e più elastico, ideale per gli esperimenti di deformazione ciclica e per fornire nutrimento alle cellule nella fase di coltura in condizioni ALI. Dai test effettuati su questa membrana è emerso come una stimolazione meccanica fisiologica (deformazione lineare del 10%) incrementi la formazione di giunzioni aderenti tra le cellule, oltre a favorire l'assorbimento di NPs, mentre una stimolazione non fisiologica (deformazione del 16.5%) induce apoptosi cellulare, attiva la risposta infiammatoria e compromette l'integrità della barriera epiteliale<sup>40</sup>.

La membrana bifasica è stata impiegata anche in uno studio di coltura dinamica di cellule epiteliali alveolari, utilizzando una versione modificata del bioreattore MALI (Fig. 11): il nuovo sistema è caratterizzato da una migliore tenuta a pressione, un supporto tale da impedire scivolamenti della membrana durante le variazioni di pressione e una misurazione continua della pressione anche nel compartimento apicale (oltre quella all'interno del reservoir)<sup>50</sup>. Il sistema è stato usato per indagare l'assorbimento cellulare e il trasporto transmembrana di micro- e nanoparticelle (1000 nm e 100 nm, rispettivamente), in seguito a stimolazione ciclica fisiologica (deformazione del 10%, frequenza 0.33 Hz). Si è visto che la deformazione ciclica influenza l'assorbimento cellulare in maniera dipendente dalle

dimensioni delle particelle (incremento nell'internalizzazione di NPs, ma invariato assorbimento di microparticelle), mentre il trasporto transmembrana di entrambi in tipi di particelle ha subito un incremento indipendente dal loro diametro<sup>50</sup>.

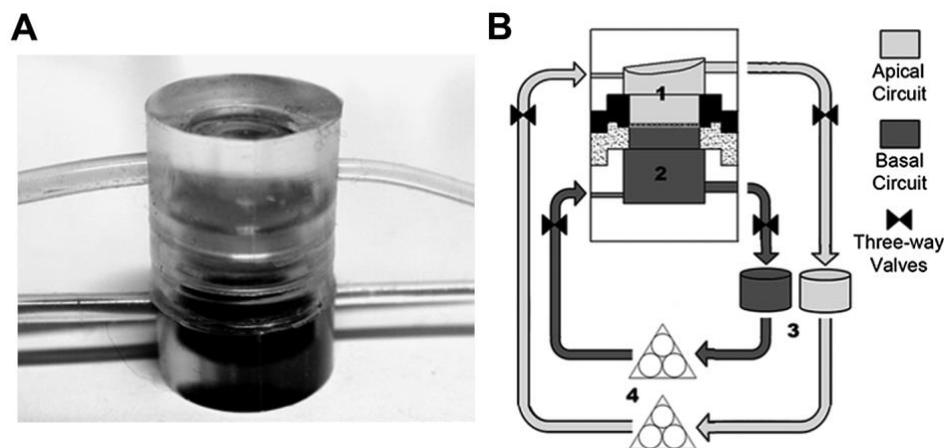


*Figura 11: Rappresentazione schematica della versione modificata del sistema MALI, sotto condizioni di coltura dinamica e stimolazione meccanica<sup>50</sup>.*

Lo stesso sistema ha permesso, in uno studio più recente, di realizzare un modello patologico di fibrosi polmonare, co-coltivando sulla membrana bifasica cellule endoteliali (sulla superficie inferiore), cellule epiteliali e fibroblasti primari (sulla superficie superiore) derivati da pazienti affetti da fibrosi polmonare idiopatica. Il modello è stato usato per confermare l'efficacia del farmaco anti-fibrotico Nintedanib, e inoltre ha dimostrato come la co-coltura favorisca la formazione di giunzioni strette e il mantenimento dell'integrità della barriera in seguito all'applicazione della stimolazione meccanica, a differenza di quanto osservato per la mono-coltura di cellule epiteliali<sup>51</sup>.

Un altro esempio di bioreattore utilizzabile per studiare le caratteristiche delle barriere fisiologiche è quello descritto da Giusti et al., costituito da una camera apicale e una basale separate da una membrana in policarbonato (Fig. 12a-b). Gli autori hanno valutato la dinamica del flusso all'interno delle due camere, e il passaggio di soluti dal compartimento apicale a quello basale in presenza di cellule epiteliali (in questo caso intestinali) coltivate sulla superficie della membrana. È stato osservato come l'integrità della barriera e l'espressione di giunzioni aderenti venga incrementata in presenza di flusso del mezzo nelle camere; inoltre, la permeabilità della barriera alle molecole di fluoresceina è risultata

significativamente più alta in condizioni dinamiche rispetto al caso statico (coltura in Transwell®)<sup>52</sup>.

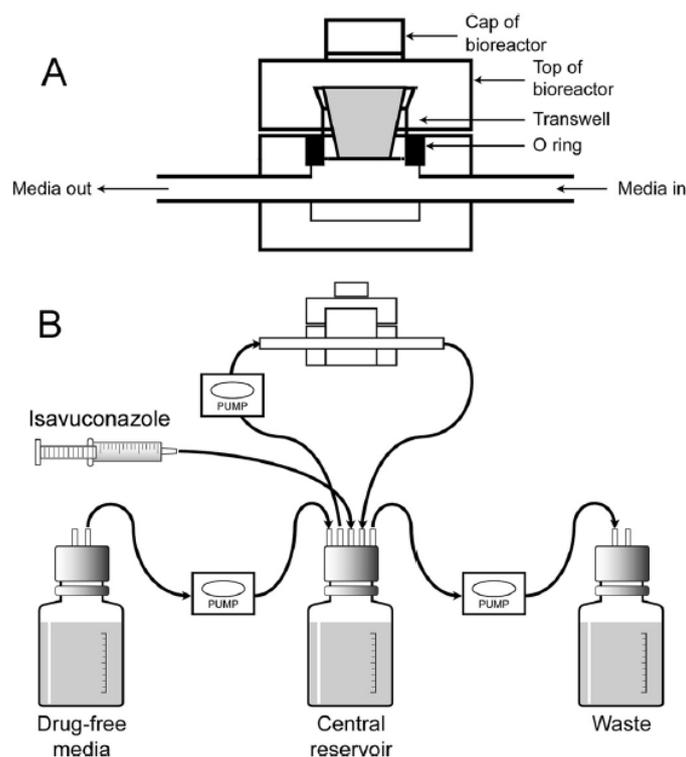


**Figura 12:** a) Fotografia del bioreattore utilizzato nello studio di Giusti et al., e b) schema del circuito<sup>52</sup>.

Alcuni studi hanno fatto uso di bioreattori in combinazione con inserti Transwell® inseriti al loro interno, in un ambiente dinamico che consentisse il flusso del mezzo a contatto con le cellule coltivate sulla superficie della membrana alloggiata nell'inserto. Questi sistemi sono stati impiegati per realizzare modelli patologici di barriere alveolari o intestinali, al fine di studiare la vitalità cellulare, l'integrità e la permeabilità della barriera epiteliale, e l'effetto di alcuni farmaci somministrati tramite il flusso del mezzo<sup>53,54</sup>.

In particolare, Box et al. hanno utilizzato un sistema di questo tipo per studiare l'efficacia antimicotica dell'isavuconazolo, principio attivo di un farmaco usato per il trattamento dell'aspergillosi polmonare invasiva (infezione polmonare causata da miceti del genere *Aspergillus*). In questo studio sono state coltivate cellule epiteliali A549 e cellule endoteliali derivate da arteria polmonare umana (HPAEC) sulle due superfici della membrana alloggiata nell'inserto Transwell®, ed è stato impiegato un bioreattore opportunamente progettato per ospitare l'inserto e far fluire il mezzo di coltura a contatto con lo strato di cellule endoteliali (Fig. 13a). Nel compartimento apicale è stata introdotta una sospensione contenente i miceti precedentemente isolati (della specie *Aspergillus fumigatus*). L'isavuconazolo è stato disciolto in metanolo e somministrato nel circuito, iniettandolo direttamente all'interno del reservoir centrale (Fig. 13b). Prelevando dei campioni di mezzo a intervalli di tempo prestabiliti, è stato possibile ricostruire il profilo di concentrazione del farmaco nel tempo (farmacocinetica) e misurare i livelli di

galattomannano, usato come biomarcatore per valutare l'efficacia antimicotica dell'isavuconazolo (farmacodinamica). Lo studio ha evidenziato importanti differenze nell'efficacia del farmaco a seconda della dose somministrata e della tipologia di micete, ma in generale i risultati suggeriscono che la maggior parte dei microrganismi appartenenti alla specie considerata può essere trattata con le dosi di farmaco attualmente utilizzate, almeno nelle fasi iniziali della patologia <sup>53</sup>.



**Figura 13:** a) Rappresentazione del bioreattore con inserto Transwell<sup>®</sup> impiegato nello studio di Box et al.; b) schema del circuito utilizzato per il flusso del mezzo di coltura e la somministrazione di isavuconazolo <sup>53</sup>.

Santbergen et al., invece, hanno realizzato un sistema Transwell<sup>®</sup> dinamico simile al precedente, ma coltivando sulla superficie superiore della membrana cellule epiteliali intestinali derivate da adenocarcinoma coloretale umano (Caco-2 e HT29-MTX). Gli autori hanno poi effettuato dei test per valutare l'integrità della barriera cellulare e la permeabilità nei confronti di alcuni farmaci (verapamil ed ergotamina). I risultati hanno mostrato la formazione di una rete di giunzioni strette tra le cellule, e per entrambi i composti è stata osservata una permeabilità simile al caso statico, confermando la formazione di una barriera intestinale funzionale anche nel sistema dinamico <sup>54</sup>.

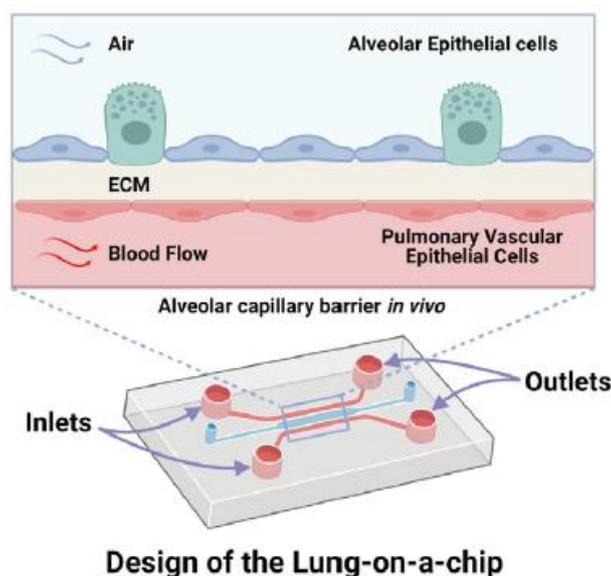
### 1.5.3.6 Lung-on-a-chip

Una nuova frontiera, che coinvolge anche i modelli *in vitro* di polmone, è quella rappresentata dagli *organ-on-a-chip* (OOC), ovvero piattaforme micro-fluidiche dotate di canali di dimensioni micrometriche continuamente perfusi, che consentono di effettuare la coltura dinamica delle cellule, e riprodurre le interazioni cellulari e le sollecitazioni meccaniche indotte dal flusso<sup>55</sup>. Questi dispositivi offrono la prospettiva di un controllo ottimizzato del processo, un monitoraggio del sistema in tempo reale mediante sistemi computerizzati, e un ridotto utilizzo delle sostanze (e quindi una riduzione dei costi)<sup>8</sup>. Un altro vantaggio è rappresentato dalla possibilità di realizzare array di dispositivi miniaturizzati, su cui effettuare un maggior numero di esperimenti simultaneamente, rispondendo all'esigenza di elevata produttività richiesta (*high throughput*)<sup>8,55</sup>. Si tratta comunque di sistemi più difficili da maneggiare, e la ridotta quantità di cellule e materiale limita la disponibilità di campione utilizzabile per effettuare analisi biologiche<sup>8</sup>. Inoltre, queste piattaforme generano elevati sforzi di taglio a parete, a causa dell'elevato rapporto superficie/volume, e sono soggette a effetti di bordo, nel senso che le cellule che si trovano nelle zone periferiche del sistema non interagiscono con le altre in maniera appropriata<sup>20</sup>. È possibile anche integrare diversi OOC in un unico sistema, connettendoli attraverso i canali micro-fluidici, in modo tale che possano comunicare tra di loro, simulando l'interazione esistente tra i vari organi all'interno del corpo. Anche le sollecitazioni meccaniche e le deformazioni cellulari che molti tessuti sperimentano *in vivo* possono essere ben riprodotte usando questi sistemi<sup>56</sup>. I canali micro-fluidici, ad esempio, devono essere progettati (in termini di lunghezza, diametro, angoli di inlet e outlet) in modo tale che gli sforzi di taglio indotti dal flusso siano simili a quelli percepiti dal tessuto naturale<sup>55</sup>. Inoltre, gli OOC possono essere utilizzati, come gli altri modelli *in vitro*, per approcci di medicina personalizzata, utilizzando ad esempio cellule primarie derivate da un determinato paziente, oppure anche iPSC<sup>55</sup>.

Il PDMS, materiale altamente permeabile ai gas, poco costoso e che permette la visualizzazione delle cellule, viene frequentemente impiegato per la realizzazione di dispositivi micro-fluidici, nonostante il suo carattere idrofobico che richiede una modifica superficiale prima della semina cellulare<sup>16,55</sup>.

I *lung-on-a-chip* (LOC) sono sistemi micro-fluidici che cercano di replicare la complessa struttura, architettura e funzione del polmone, o delle sue unità funzionali, al fine di modellare condizioni fisiologiche o patologiche<sup>55</sup>. Per poter ricreare la barriera alveolo-

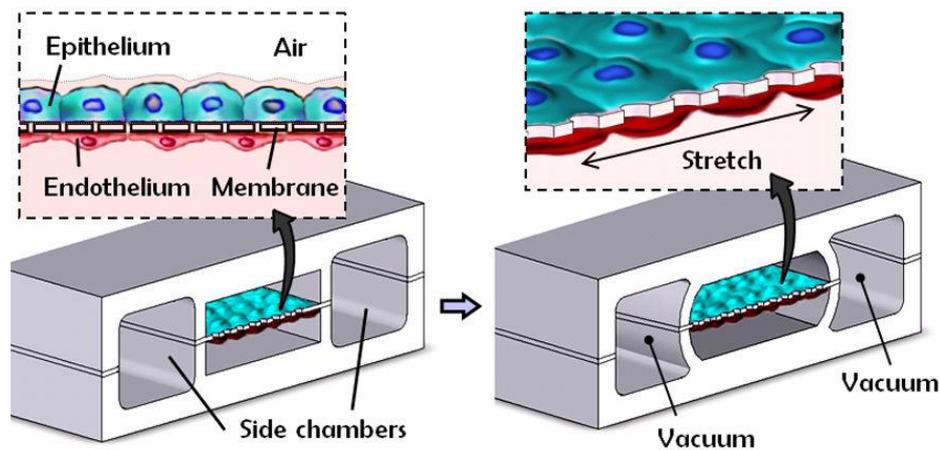
capillare in questi dispositivi, vengono posizionate, tra i canali micro-fluidici, membrane porose (in genere rivestite con collagene) che dovrebbero conferire una certa tridimensionalità al sistema, mimando la ECM naturale <sup>16</sup>. Cellule epiteliali alveolari e cellule endoteliali possono essere coltivate sui due lati della membrana, esposte rispettivamente ad aria e mezzo di coltura (Fig. 14), ed eventualmente deformate ciclicamente per riprodurre il meccanismo della respirazione <sup>55</sup>.



**Figura 14:** Design di un sistema micro-fluidico per la realizzazione di un modello di barriera alveolo-capillare <sup>55</sup>.

Un'interessante prospettiva è quella di utilizzare i sistemi micro-fluidici per testare farmaci. Si stima che più di 380 farmaci possano causare tossicità a livello polmonare, ed esistono pochi sistemi in grado di indagare questo fenomeno <sup>16</sup>. I modelli basati su LOC simulano in maniera accurata le funzioni e il microambiente polmonare *in vivo*. Per cui l'impiego di questi dispositivi, magari integrando cellule appartenenti a diverse regioni del tratto respiratorio inferiore, potrebbe consentire una migliore valutazione sulla sicurezza ed efficacia dei farmaci, permettendo di effettuare un ulteriore screening prima dell'utilizzo negli esseri umani <sup>16,55</sup>. Inoltre, l'integrazione di più OOC in un'unica piattaforma può essere utile per effettuare studi più completi sulla risposta dell'organismo alla somministrazione di un certo farmaco <sup>55</sup>.

In base allo scopo dello studio, e al processo fisiologico che deve essere replicato, possono essere progettati dispositivi di diverso tipo<sup>55</sup>. Nel 2010, Huh et al. hanno sviluppato un modello di barriera basato su un sistema micro-fluidico, formato da due micro-canali separati da una membrana in PDMS (rivestita con fibronectina), e in grado di riprodurre le condizioni ALI. Sulle due superfici della membrana sono state coltivate cellule epiteliali alveolari ed endoteliali polmonari, e per indurre la deformazione ciclica della membrana cellularizzata sono state impiegate due camere laterali in cui veniva applicato il vuoto (Fig. 15)<sup>57</sup>. Dagli studi effettuati su questo dispositivo si è visto che la sollecitazione ciclica causa l'allineamento delle cellule nella direzione della deformazione, induce una maggiore permeabilità della barriera (incrementando il trasporto di NPs di silice dal compartimento alveolare a quello vascolare), e aumenta la reazione infiammatoria indotta dalle NPs. Inoltre, analizzando la risposta a batteri e citochine infiammatorie introdotte nel canale alveolare, è stata osservata un'attivazione delle cellule endoteliali sottostanti e il passaggio di neutrofili dal canale vascolare verso quello alveolare, situazione simile a ciò che si verifica *in vivo*<sup>57,58</sup>.

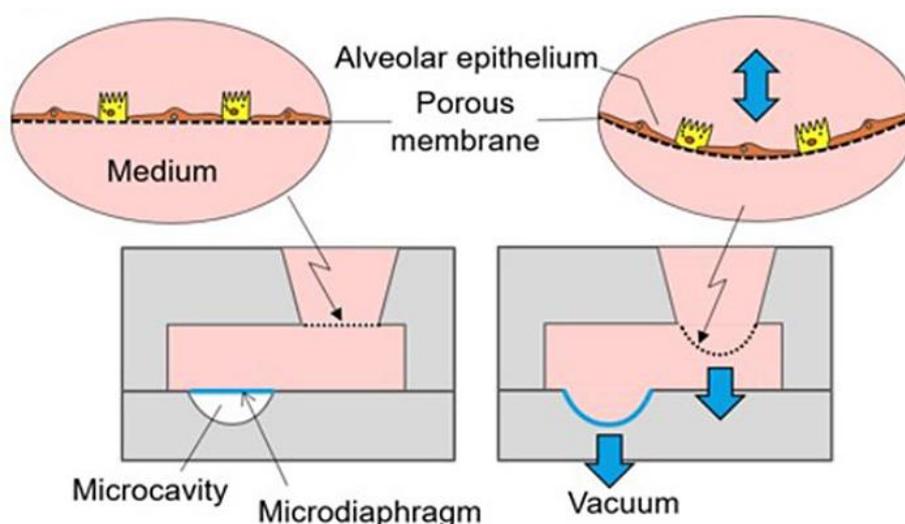


**Figura 15:** Lung-on-a-chip impiegato nello studio di Huh et al. per modellare la barriera alveolo-capillare<sup>57</sup>.

Hassell et al. hanno realizzato un modello patologico di interfaccia alveolo-capillare su chip micro-fluidico, con cellule di adenocarcinoma umano seminate, insieme alle cellule epiteliali, sulla superficie superiore di una membrana in PET, e cellule endoteliali seminate su quella inferiore. I risultati hanno mostrato una maggiore proliferazione delle cellule tumorali in condizioni di coltura dinamica su questo dispositivo, rispetto alla coltura statica

su piastra (condizioni non fisiologiche), ma applicando una stimolazione meccanica ciclica la crescita tumorale viene significativamente ridotta. Gli autori ritengono che *in vivo* l'ostruzione dello spazio alveolare causata dalla presenza di cellule tumorali possa ridurre il movimento della barriera durante il ciclo respiratorio, innescando quindi un feedback positivo che porta all'ulteriore proliferazione delle cellule tumorali e al progredire della malattia<sup>59</sup>.

Un altro metodo che si può utilizzare sui sistemi micro-fluidici per indurre una deformazione ciclica della membrana è quello proposto da Stucki et al., che hanno introdotto, nella parte inferiore del dispositivo, un micro-diaframma che viene deflesso facendo il vuoto nella cavità sottostante. Il movimento del micro-diaframma, causando uno spostamento del mezzo nel canale vascolare, viene così trasferito direttamente alla membrana in PDMS (sulle cui superfici sono state seminate cellule epiteliali ed endoteliali), che si deforma ciclicamente. Nel loro studio, gli autori hanno osservato come la stimolazione meccanica aumenti la permeabilità della barriera epiteliale e la secrezione di citochine, ma senza influenzare la proliferazione delle cellule e l'integrità del layer cellulare<sup>60</sup>. Lo stesso metodo è stato utilizzato anche da Felder et al. (Fig. 16), per analizzare l'influenza della stimolazione meccanica sulla guarigione di ferite ai danni dell'epitelio alveolare, dimostrando che una deformazione ciclica fisiologica rallenta il processo di guarigione<sup>61</sup>.



**Figura 16:** Lung-on-a-chip dotato di micro-diaframma che viene deflesso facendo il vuoto nella cavità sottostante<sup>61</sup>.

Un esempio di *lung-on-a-chip* impiegato per testare l'efficacia di agenti terapeutici è stato descritto da Jain et al., che hanno realizzato un dispositivo costituito sempre da due canali micro-fluidici, separati da una membrana. Le cellule epiteliali, seminate sulla superficie superiore della membrana, sono state esposte all'aria contenuta nel compartimento soprastante, mentre il canale inferiore, attraversato da sangue intero, è stato internamente rivestito con cellule endoteliali. Si è visto che l'introduzione di una citochina infiammatoria nel compartimento alveolare aumenta la permeabilità della barriera in maniera dose-dipendente e promuove l'attivazione dell'endotelio sottostante, con conseguente formazione di trombi (stesso effetto ottenuto in seguito all'esposizione a LPS). Gli autori hanno quindi sfruttato questo dispositivo per valutare l'effetto di un potenziale farmaco antinfiammatorio e antitrombotico, osservando come il trattamento dell'endotelio con questo farmaco riduca effettivamente la formazione di trombi<sup>62</sup>.

## CAPITOLO 2: MATERIALI E METODI

### 2.1 Materiali

#### 2.1.1 Bioreattore LiveBox2

In questo lavoro di tesi, al fine di realizzare un modello *in vitro* di barriera alveolo-capillare, è stato impiegato il bioreattore LiveBox2 (LB2), fornito dall'azienda IVTech S.R.L. Si tratta di un bioreattore bi-compartmentale, dotato di un apposito supporto (*holder*, Fig. 17a) su cui viene alloggiata una membrana porosa che separa la camera basale (Fig. 17b) da quella apicale (Fig. 17c). Ciascuna camera, realizzata in silicone di grado medico, è dotata di un tubo di ingresso e uno di uscita (con diametro interno rispettivamente di 1 mm e 2 mm) per consentire il flusso del mezzo di coltura. La camera basale ha un volume inferiore rispetto a quella apicale (1 mL e 1.5 mL, rispettivamente).

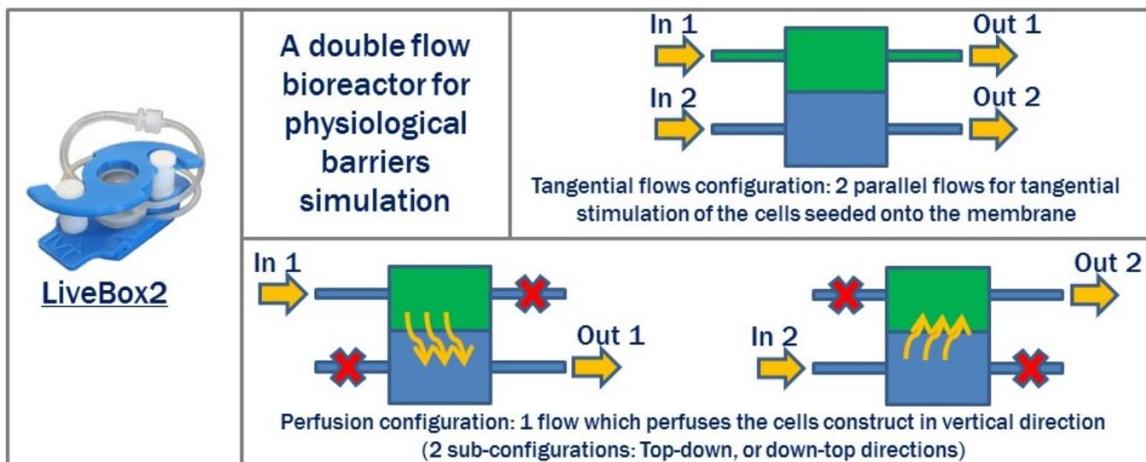


*Figura 17: a) holder, b) camera basale e c) camera apicale del bioreattore LB2.*

Il volume interno del bioreattore è chiuso tramite due dischi in vetro (vetrini coprioggetto, grado 1; sono posti uno nella parte inferiore e uno in quella superiore) e un apposito sistema (*clamp system*, costituito da tre elementi: base inferiore ed *s-shape* in ABS per la chiusura superiore, ed un *low friction ring* in Delrin per evitare la rotazione della parte siliconica durante la chiusura) che assicura stabilità e garantisce la tenuta idraulica sia in condizioni statiche che dinamiche. I dischi in vetro trasparente consentono di effettuare imaging in tempo reale dell'ambiente interno al bioreattore. Il supporto rimovibile su cui è alloggiata la membrana consente una manipolazione facile e sicura della stessa, e il successivo utilizzo nelle analisi post-coltura cellulare <sup>63</sup>.

Il bioreattore LB2 può essere utilizzato in diverse configurazioni (Fig. 18):

- Configurazione del flusso in perfusione (adatta per la perfusione di costrutti cellularizzati), in cui le linee di flusso attraversano il costrutto in direzione verticale. È possibile implementare due sotto-configurazioni, in base alla direzione del flusso: configurazione *top-down* (perfusione dall'alto verso il basso, chiudendo il tubo in uscita dalla camera apicale e quello in ingresso alla camera basale) o *down-top* (perfusione dal basso verso l'alto, chiudendo il tubo in ingresso alla camera apicale e quello in uscita dalla camera basale)<sup>63</sup>.
- Configurazione di flusso tangenziale (adatta alla simulazione di barriere fisiologiche), in cui le camere apicale e basale sono attraversate da due flussi indipendenti. Le linee di flusso sono parallele alla superficie della membrana<sup>63</sup>.
- Configurazione ALI, variante della precedente in cui solo la camera basale viene riempita con il mezzo di coltura. Il disco in vetro posizionato sulla parte superiore del bioreattore può essere sostituito dall'apposita *porta d'accesso* (Fig. 19): questa può essere inserita e rimossa senza dover disassemblare il sistema, consentendo quindi un facile accesso anche alla superficie superiore della membrana su cui vengono seminate le cellule. La tenuta idraulica è assicurata dalla presenza di un tappo siliconico inserito nella porta d'accesso.



**Figura 18:** Possibili configurazioni del bioreattore LB2: flusso tangenziale (in alto) e flusso in perfusione (top-down e down-top, in basso)<sup>63</sup>.



*Figura 19: Bioreattore LB2 chiuso superiormente con la porta d'accesso montata al posto del vetrino superiore, con il suo tappo siliconico.*

## **2.1.2 Componenti del circuito**

Una volta assemblato, il bioreattore LB2 può essere connesso agli altri elementi che compongono il sistema, in modo da ottenere un circuito fluidico con cui realizzare la coltura dinamica. Le varie parti del circuito sono collegate tra loro mediante tubi in silicone di grado medico estrusi (sterilizzabili e permeabili ai gas) e connettori Luer-lock. Oltre il bioreattore, i componenti del sistema utilizzato in questo lavoro sono:

- LiveFlow (IVTech S.R.L., Massarosa (LU), Italia, Fig. 20), pompa peristaltica dotata di due teste pompanti, ciascuna delle quali può alimentare fino a due circuiti indipendenti.



*Figura 20: Pompa peristaltica LiveFlow <sup>64</sup>.*

La pompa è dotata di un cassetto in grado di ospitare fino a quattro bioreattori, per cui è possibile eseguire fino a quattro esperimenti indipendenti in parallelo <sup>64</sup>. Per ciascuna testa pompante è possibile selezionare la direzione del flusso (orario o antiorario) e impostare la portata desiderata, che può variare fra 50 e 500  $\mu\text{L}/\text{min}$ , a passi di 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

- LivePa (IVTech S.R.L., Massarosa (LU), Italia, Fig. 21), attuatore meccanico che permette di applicare una sovrappressione statica all'interno del bioreattore, mediante un pistone che va ad occludere parzialmente il tubo di uscita di una delle due camere (in condizioni ALI, è possibile applicare la sovrappressione solamente in camera basale). Il LivePa permette di impostare un valore definito *passo incrementale* (compreso tra 0 e 9), che rappresenta il grado di occlusione esercitato dal pistone. È possibile, inoltre, impostare il range di portata a cui si sta lavorando (50-90, 100-190, 200-290, 300-500  $\mu\text{L}/\text{min}$ ).



*Figura 21: Attuatore meccanico LivePa <sup>65</sup>.*

- Mixing Chamber, un reservoir contenente il mezzo di coltura fresco che viene prelevato dalla pompa peristaltica per essere mandato in ingresso al bioreattore. In questo caso, il mezzo di coltura fresco si mescola con quello esausto in uscita dal bioreattore (ricircolo del mezzo). Il numero di reservoirs è pari al numero dei circuiti indipendenti attivati (in condizioni ALI si ha solo un reservoir, in quanto è presente solo il circuito relativo alla camera basale).

## 2.1.3 Materiali delle membrane

In questa sede sono state utilizzate due tipologie di membrane porose da inserire all'interno del bioreattore:

- Membrane commerciali in PET (IVTech S.R.L., Massarosa (LU), Italia), aventi uno spessore di 12  $\mu\text{m}$  e pori con un diametro di 0.45  $\mu\text{m}$ ;
- Membrane realizzate a partire da una soluzione di PCL (Sigma-Aldrich, cod. 1002280682) e gelatina di tipo A (Sigma-Aldrich, cod. 1002280682). Per la preparazione delle soluzioni di partenza, si sono utilizzati solventi come acido acetico (Sigma-Aldrich) e acido formico (Sigma-Aldrich). Il PCL utilizzato è in forma di granuli e con peso molecolare di 80 kDa. La gelatina (Gel), ottenuta da pelle suina, è in forma di polvere e ha una solubilità di 50 mg/mL in  $\text{H}_2\text{O}$ . Per aumentare la stabilità della gelatina in ambiente acquoso e impedirne la degradazione, è stato effettuato il cross-linking utilizzando come agente reticolante il 3-(glicidossipropil)trimetossisilano (GPTMS, Sigma-Aldrich).

### 2.1.3.1 Caratteristiche e proprietà dei materiali

Il PET è un polimero termoplastico appartenente alla famiglia dei poliesteri, e si ottiene da una reazione di policondensazione a partire dai monomeri glicole etilenico e acido tereftalico <sup>66</sup>. La temperatura (T) di transizione vetrosa è compresa tra 65 e 80 °C, in funzione del grado di cristallinità, mentre la T di fusione si trova all'interno del range 240-270 °C <sup>67</sup>. Il PET è un materiale ampiamente utilizzato in diverse applicazioni, anche in campo biomedico, grazie alla sua buona biocompatibilità, resistenza meccanica e a fatica, tenacità, stabilità dimensionale ed elevata uniformità di struttura, oltre che resistenza all'abrasione e agli agenti chimici <sup>68,69</sup>.

Tuttavia, la bassa energia superficiale di cui è dotato questo materiale comporta una scarsa bagnabilità e adesione cellulare, il che rende spesso necessaria una modifica superficiale, per esporre gruppi funzionali e sequenze specifiche in grado di rendere il materiale maggiormente adesivo <sup>8,69</sup>. Inoltre, sempre a causa delle sue proprietà superficiali (grado di idrofobicità e bassa energia), il PET sembra essere un materiale facilmente incline alla contaminazione batterica. Per questo motivo in genere è necessario modificare la superficie mediante strategie di funzionalizzazione o rivestimenti in grado di conferire al materiale

proprietà antibatteriche o battericide. Queste strategie sembrano molto promettenti soprattutto in applicazioni che prevedono l'impianto del materiale all'interno del corpo, nell'ottica di prevenire l'insorgere di malattie infettive <sup>68</sup>.

Il PCL è un poliestere biodegradabile che si ottiene per polimerizzazione tramite apertura dell'anello del monomero  $\epsilon$ -caprolattone. È un polimero semicristallino, caratterizzato da un punto di fusione piuttosto basso (58-60 °C), e una T di transizione vetrosa di -60 °C <sup>70,71</sup>. A T ambiente, il PCL è solubile in solventi organici come il cloroformio e il diclorometano, ma non è solubile negli alcoli e in acqua <sup>72</sup>. Il tempo di degradazione del PCL varia in funzione del peso molecolare, del grado di cristallinità, e del meccanismo di degradazione: in particolare all'interno del corpo umano, dove non può essere degradato per via enzimatica (a causa dell'assenza degli enzimi adatti), il PCL va incontro a degradazione per idrolisi dei suoi legami esterei, processo molto più lento che può richiedere 2-3 anni per essere completato. Questa caratteristica del PCL ha suscitato un grande interesse per il suo possibile utilizzo come biomateriale, in particolare per la realizzazione di dispositivi impiantabili a lungo termine. Può essere impiegato anche per incapsulare farmaci, per ottenere un rilascio controllato e prolungato nel tempo <sup>70,72</sup>.

Inoltre, la possibilità di combinare facilmente il PCL con altri materiali, polimerici ma anche ceramici, per poterne modulare le proprietà a seconda dell'applicazione, è uno degli aspetti più interessanti di questo polimero (insieme alla sua biocompatibilità, facile lavorabilità, buone proprietà meccaniche e basso costo), che lo rendono un materiale molto utilizzato in campo biomedico, ad esempio nella fabbricazione di scaffold per l'ingegneria dei tessuti, ma anche nella realizzazione di modelli *in vitro* <sup>73,74</sup>.

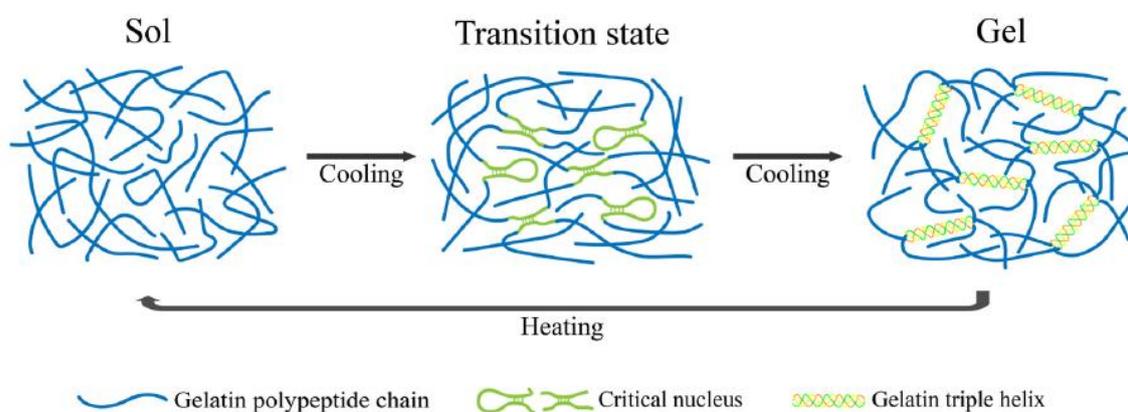
Per quanto riguarda le proprietà meccaniche del PCL, occorre specificare che, nonostante il materiale in forma di bulk sia caratterizzato da un modulo di Young abbastanza elevato (330-360 MPa) e da una resistenza a trazione di 25-43 MPa, è possibile realizzare facilmente delle strutture fibrose, che per la presenza dei pori risultano molto più elastiche e consentono l'impiego del materiale anche in applicazioni legate ai tessuti molli. L'elettrospinning, tecnica più comunemente utilizzata per la fabbricazione di queste strutture, permette di variare la disposizione e la dimensione delle fibre, adattando i parametri di lavorazione per ottenere le proprietà meccaniche desiderate <sup>75</sup>.

Uno svantaggio del PCL è dato dal suo carattere idrofobico, che influenza negativamente l'adesione cellulare, per cui spesso si ricorre a strategie di funzionalizzazione della superficie con sequenze peptidiche (RGD, GRGDSP, PSHRN e IKVAV) che favoriscano

l'adesione e la proliferazione delle cellule seminate, o alla combinazione del PCL con polimeri naturali, come il chitosano, il collagene o la gelatina <sup>73,76</sup>.

Tra i polimeri naturali, la gelatina è una proteina di origine animale, che si ottiene in seguito all'idrolisi parziale del collagene. La gelatina che si ricava da questo processo ha un peso molecolare che varia tra 15 e 250 kDa e, a seconda che si effettui un pretrattamento in condizioni acide o basiche, si possono ottenere due tipi di gelatina, rispettivamente di tipo A (punto isoelettrico 8-9) e di tipo B (punto isoelettrico 4-5) <sup>77</sup>. Per cui la gelatina di tipo A avrà carica positiva a pH fisiologico, mentre quella di tipo B avrà carica negativa. Questa caratteristica influenza la biocompatibilità, che sarà migliore nel caso della gelatina di tipo B <sup>78</sup>. Le proprietà della gelatina dipenderanno anche dal tipo di collagene (tipo I, tipo II, ecc.) e dalla specie animale da cui viene ricavato <sup>79</sup>. Poiché la gelatina deriva dalla denaturazione del collagene, la sua composizione amminoacidica sarà molto simile a quella del polimero di partenza. In particolare, la catena polipeptidica della gelatina è composta da 18 amminoacidi, di cui i più importanti sono Glicina, Prolina e Idrossiprolina <sup>77,78</sup>.

La gelatina ha un comportamento termosensibile: a temperature superiori ai 20-30 °C (T di transizione sol-gel) si trova in forma di soluzione, e le catene polipeptidiche hanno una struttura di tipo *random coil*. A temperature inferiori, invece, va incontro a gelificazione, per cui viene parzialmente ripristinata la struttura a tripla elica tipica delle molecole di collagene (mentre il resto della struttura rimane *random coil*, Fig. 22) <sup>77,79,80</sup>. Gli amminoacidi Prolina e Idrossiprolina hanno un ruolo fondamentale nel processo di gelificazione <sup>78</sup>.



**Figura 22:** Rappresentazione del comportamento termosensibile della gelatina <sup>77</sup>.

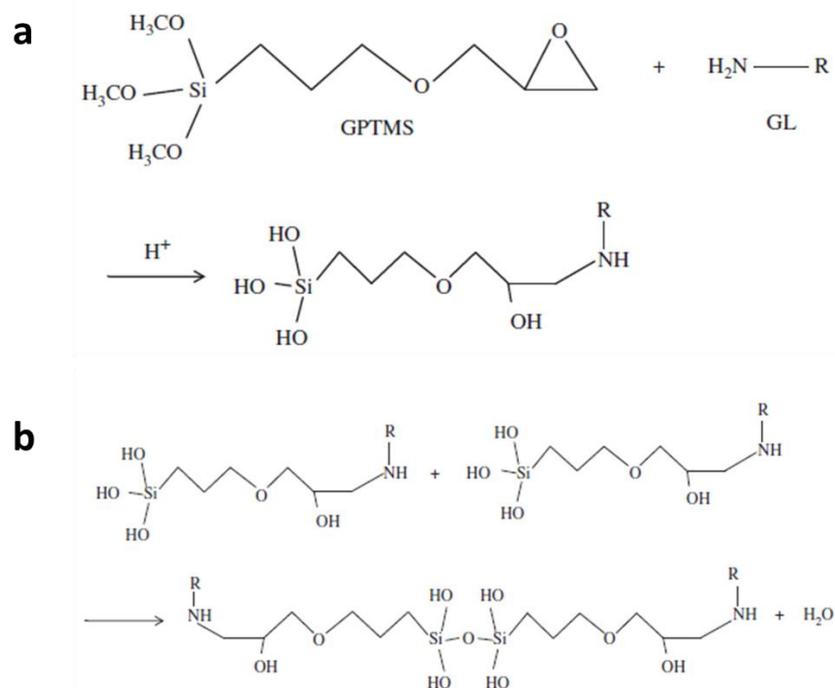
La gelatina è ampiamente utilizzata in campo biomedico grazie alle sue proprietà di biocompatibilità, biodegradabilità, bassa immunogenicità, e alla capacità di supportare l'adesione e crescita cellulare, grazie al suo elevato grado di idrofilicità, alla presenza di legami idrogeno tra i suoi gruppi idrofilici, e alla sequenza peptidica RGD (sito preferenziale di adesione per le cellule)<sup>78,80</sup>. È inoltre un materiale facilmente lavorabile e meno costoso rispetto al collagene<sup>79</sup>. Tuttavia, la gelatina presenta scarse proprietà meccaniche e si degrada molto rapidamente in ambiente fisiologico, fattori che limitano il suo impiego come biomateriale in quanto tale. Per superare queste limitazioni, spesso si rende necessario combinarla con altri polimeri, o sottoporla a dei trattamenti di modifica<sup>78</sup>. In particolare, una delle strategie maggiormente utilizzate è quella di reticolare la gelatina, in modo da stabilizzarne la struttura ed evitarne la dissoluzione alla temperatura corporea. I metodi di reticolazione possono essere divisi in tre categorie:

- Cross-linking di tipo fisico (trattamento al plasma, irraggiamento mediante fascio di elettroni o raggi  $\gamma$ ), che permette di reticolare la gelatina senza l'impiego di composti potenzialmente tossici, ma in genere consente di ottenere un basso grado di reticolazione e proprietà meccaniche non ottimali<sup>79</sup>.
- Cross-linking di tipo chimico, che si basa sulla formazione di legami covalenti tra le catene polimeriche della gelatina, consentendo di ottenere un materiale più stabile e con proprietà meccaniche migliori rispetto ai metodi di tipo fisico. Possono essere utilizzati agenti reticolanti che vengono rimossi al completamento della reazione (come nella tecnica delle carbodiimmidi), oppure incorporati nella matrice polimerica. Tra questi ultimi, i metodi più comunemente impiegati prevedono l'utilizzo della glutaraldeide (che permette di avere una buona efficienza, ma presenta problemi in termini di sicurezza e tossicità), della genipina (molto utilizzata, nonostante il suo elevato costo, per le proprietà antinfiammatorie e la biocompatibilità del prodotto ottenuto), oppure la modifica della gelatina mediante anidride metacrilica e successivo irraggiamento UV (con l'aggiunta di un fotoiniziatore), per ottenere gelatina metacrilata (GelMA). Un'altra possibilità è quella di utilizzare, come è stato fatto in questo lavoro, il GPTMS, un organosilano che può essere usato come agente reticolante biocompatibile, aggiungendolo alla soluzione polimerica contenente la gelatina. In questo caso, durante la reazione di reticolazione, gli anelli di ossido di etilene delle molecole di GPTMS reagiscono con i gruppi amminici della gelatina e, in seguito all'idrolisi dei gruppi trimetossilici

del GPTMS, si formano gruppi silanolo (Si-OH) pendenti (Fig. 23a). Dopodiché, durante l'evaporazione del solvente, avviene la condensazione di due gruppi Si-OH che porta alla formazione dei legami covalenti Si-O-Si (Fig. 23b), i quali legano tra loro le catene polimeriche e permettono di ottenere una struttura reticolata <sup>79</sup>.

Poiché il GPTMS viene aggiunto alla soluzione prima del processo di fabbricazione di una o membrana o scaffold, si evita di alterare la morfologia delle fibre prodotte, problema che invece si può verificare quando lo step di reticolazione viene eseguito a valle del processo (a causa del rigonfiamento delle fibre di gelatina, e della parziale dissoluzione nel mezzo contenente l'agente reticolante) <sup>81</sup>.

In uno studio che ha confrontato il GPTMS con la genipina, ampiamente utilizzata come agente per il cross-linking della gelatina, è stato osservato come i campioni reticolati con il GPTMS siano caratterizzati da una maggiore stabilità in ambiente acquoso, con un tasso di dissoluzione leggermente inferiore, a causa delle catene idrofobiche presenti nel GPTMS. Tuttavia, la ridotta idrofilicità si traduce anche in una minore bagnabilità e in una più lenta proliferazione cellulare rispetto ai campioni reticolati con la genipina <sup>82</sup>.



**Figura 23:** Processo di reticolazione della gelatina mediante GPTMS: **a)** formazione dei gruppi silanolo pendenti e **b)** condensazione di due gruppi Si-OH per ottenere un legame Si-O-Si <sup>81</sup>.

- Cross-linking per via enzimatica, che può essere utilizzato sempre per promuovere la formazione di legami covalenti tra le catene polimeriche, ma sfruttando l'azione di un catalizzatore enzimatico (es. transglutaminasi, tirosinasi) <sup>79</sup>.

### 2.1.4 Sensore di pressione

Per monitorare la pressione all'interno della camera basale del bioreattore, i valori sono stati acquisiti utilizzando il sensore PX409-USBH-476924 (Omega™), in grado di rilevare la pressione in un range compreso tra -7 e +7 kPa.

### 2.1.5 Linee cellulari

Per svolgere i test cellulari, al fine di riprodurre l'interfaccia alveolo-capillare, sono state impiegate due linee: cellule epiteliali della linea A549 (ATCC), seminate sulla superficie superiore della membrana, e cellule endoteliali polmonari della linea HuLEC-5A (ATCC), seminate sulla superficie inferiore della membrana.

### 2.1.6 Materiali per la marcatura cellulare

Le cellule sono state marcate per poterle visualizzare in fluorescenza. In particolare, per effettuare lo *staining* sono stati utilizzati due coloranti specifici: la falloidina (BioLegend), che si lega ai filamenti di F-actina del citoscheletro, e il 4',6-diamidin-2-fenilindolo (DAPI, Invitrogen), che forma legami con i nuclei delle cellule. Prima della fase di *staining*, sono stati utilizzati anche una soluzione di paraformaldeide e il Triton X-100, rispettivamente per fissare le cellule e per aumentare la permeabilità della membrana cellulare.

Per il protocollo di immunofluorescenza, inoltre, sono stati impiegati gli anticorpi primari anti-CD31 e anti-E-caderina, e i rispettivi anticorpi secondari anti-*rabbit* (*Secondary Alexa Fluor 555 goat anti-rabbit*, Invitrogen) e anti-*mouse* (*Secondary Cyan5 goat anti-mouse*, Invitrogen), in grado di legarsi ai primari per poter osservare in fluorescenza le proteine di interesse.

## 2.2 Metodi

### 2.2.1 Processo di fabbricazione delle membrane in PCL/Gel

Le membrane nanofibrose in PCL/Gel sono state ottenute mediante la tecnica dell'electrospinning. Per prima cosa, sono stati preparati 5 mL di una soluzione di PCL e gelatina, con una concentrazione totale di polimero del 15% [w/V]. PCL e gelatina sono stati dispersi, in un rapporto PCL/Gel pari a 80/20 [w/w], in una miscela di acido acetico e acido formico (in rapporto 1/1 [V/V]). Dopodiché, la soluzione è stata posta in un agitatore magnetico e lasciata in agitazione per 24h a 350 rpm. Trascorse 24h, è stato aggiunto alla soluzione il reticolante GPTMS in concentrazione 3.68% [V/V], e il sistema è stato lasciato in agitazione per altri 30 min a 350 rpm. In seguito, la soluzione è stata caricata all'interno di una siringa per eseguire il processo di electrospinning, in configurazione verticale. Per questa operazione, sono stati impostati i seguenti parametri:

- Differenza di potenziale tra ugello e collettore:  $\Delta V = 20$  kV (impostando valori di tensione di 16 kV e -4 kV, rispettivamente in corrispondenza della punta dell'ago e del collettore).
- Portata di estrusione:  $Q = 500$   $\mu$ L/h.
- Volume della siringa:  $V = 5$  mL.
- Distanza tra ugello e collettore:  $d = 12$  cm.

Le fibre sono state raccolte su un foglio di alluminio posto in corrispondenza del collettore piano. Ogni 30 min, l'ugello di estrusione è stato spostato di 5 cm sul piano XY (corrispondente al piano del collettore), fino a ricoprire il foglio di alluminio, in modo da ottenere membrane con uno spessore sufficiente per evitarne la rottura durante il posizionamento sul supporto del bioreattore, e minimizzare inoltre il passaggio di liquido dalla camera basale a quella apicale in condizioni ALI.

### 2.2.2 Misurazioni di pressione

Al fine di applicare una pressione nota al sistema durante la coltura cellulare e simulare una condizione patologica o movimentare una membrana elastica, è stato necessario calibrare il sistema. L'obiettivo di questa fase era quello di monitorare la pressione all'interno della

camera basale, e valutarne l'incremento in seguito alla parziale occlusione del tubo di uscita. Questa condizione, ottenuta azionando il pistone del LivePa, dovrebbe permettere di simulare la sollecitazione meccanica sperimentata dagli alveoli durante la respirazione. L'incremento di pressione, infatti, è correlato alla deformazione subita dalla membrana che separa le due camere del bioreattore, ed è quindi di fondamentale importanza per poter prevedere gli sforzi cui saranno sottoposte le cellule.

Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando il bioreattore in configurazione ALI, alimentando con acqua bidistillata in circuito relativo alla camera basale, il tutto all'interno di un incubatore per replicare le condizioni di lavoro. I valori di pressione sono stati acquisiti utilizzando sia la membrana commerciale in PET, sia la membrana in PCL/Gel precedentemente ottenuta mediante electrospinning.

### 2.2.2.1 Setup del sistema

Al fine di rendere ripetibile l'esperimento, e ottenere misure di pressione affidabili, si è cercato di stabilire un setup ottimale per il sistema. Innanzi tutto, sono state assemblate le varie parti del bioreattore, con i seguenti accorgimenti: il vetrino inferiore è stato sostituito da un modulo in silicone, dotato di un tubo di uscita, creato appositamente per connettere il sensore con cui effettuare le misure di pressione in camera basale. Il suddetto modulo deve essere posizionato sulla base del *clamp system* prima di alloggiare la camera basale. Dopodiché vengono sistemati l'*holder* (con la membrana già alloggiata su di esso) e la camera apicale (con relativo *top* in silicone). Il vetrino superiore è stato sostituito dall'apposita porta d'accesso (che deve essere mantenuta chiusa con il tappo siliconico durante le acquisizioni). Infine, il bioreattore è stato chiuso nella parte superiore mediante il *low friction ring* e l'*s-shape* del *clamp system*.

Dopo aver assemblato il bioreattore, è stato effettuato il riempimento del solo circuito fluidico. Il reservoir, contenente 10 mL di acqua bidistillata, è stato inizialmente collegato con la testa pompante, affinché i tubi del circuito venissero riempiti mediante l'utilizzo della pompa peristaltica. Questa operazione si è resa necessaria per evitare l'ingresso di aria in camera durante il successivo collegamento del LB2. In seguito, è stato riempito il bioreattore solamente a livello della camera basale (per riprodurre l'interfaccia aria-liquido), utilizzando una siringa Luer-lock. I tubi di connessione tra bioreattore e sensore (tubo in uscita dalla camera basale e tubo in ingresso al sensore) sono stati riempiti

delicatamente tramite una siringa ad ago, e successivamente collegati tra loro. Infine, per connettere il bioreattore con il resto del circuito, i tubi di ingresso e uscita dalla camera basale sono stati collegati rispettivamente con la testa pompante e il reservoir (tubo con diametro maggiore). Il bioreattore, il reservoir e il modulo LivePa sono stati alloggiati nell'apposito cassetto della pompa peristaltica, ottenendo la configurazione rappresentata in Fig. 24.

Tutto il sistema è stato quindi inserito in incubatore, in modo da avere condizioni controllate (temperatura di 37°C e 5% di CO<sub>2</sub>) più simili a quelle dell'ambiente fisiologico. A questo proposito, occorre specificare che tutte le fasi di riempimento precedentemente descritte sono state effettuate utilizzando acqua a una temperatura di 37°C, in modo tale da minimizzare la variazione termica al momento dell'inserimento in incubatore (che avrebbe potuto causare un'eccessiva formazione di bolle nel circuito, dovuta alla variazione di solubilità dell'aria nel liquido).



*Figura 24: Configurazione del circuito con bioreattore, reservoir e modulo LivePa alloggiati nell'apposito cassetto della pompa peristaltica.*

Al fine di ottenere misure di pressione più affidabili, il sensore è stato posizionato su un piano inferiore rispetto al resto del sistema, utilizzando un supporto rigido e delle fascette sganciabili in Nylon per bloccarlo alla griglia dell'incubatore, in modo da evitare spostamenti che avrebbero potuto causare delle false oscillazioni dei valori di pressione. Sempre al fine di minimizzare le interferenze con le misure, si è cercato di mantenere il

tubo del sensore disteso e con un'inclinazione di circa 90° rispetto al tubo di collegamento con il bioreattore (Fig. 25).

È stata poi azionata nuovamente la pompa peristaltica (impostando una portata di 200  $\mu\text{L}/\text{min}$ , per 15 min) per favorire la fuoriuscita di eventuali bolle d'aria rimaste all'interno della camera basale, nei tubi della testa pompante o a livello dei connettori. Infine, dopo aver verificato l'assenza di bolle nel circuito, è stata aperta la terza via del reservoir per altri 15 min, per far riequilibrare il sistema, prima di procedere con l'acquisizione dei valori di pressione.



*Figura 25: Disposizione del sistema all'interno dell'incubatore.*

### 2.2.2.2 Fasi di acquisizione della pressione

Sulla base del protocollo utilizzato in un lavoro precedente <sup>83</sup>, per ogni misurazione sono state ripetute sistematicamente le seguenti fasi:

- Statico (1h): prima fase, che ha permesso di tenere in considerazione il contributo di pressione dato esclusivamente dall'acqua e dalla geometria presente nel circuito. Questa fase è stata quindi eseguita con il circuito interamente collegato, ma senza l'azione di LiveFlow e LivePa.

- Controllo (30 min): seconda fase, eseguita azionando solo la pompa LiveFlow, impostando una portata di 200  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Questa fase aveva lo scopo di valutare l'incremento pressorio dato dall'azione della pompa peristaltica.
- Acquisizione (1h): terza fase, effettuata azionando contemporaneamente LiveFlow (con una portata di 200  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) e LivePa, allo scopo di valutare l'incremento pressorio derivato dall'azione dell'attuatore meccanico, e quindi dall'occlusione del tubo di uscita dalla camera basale.
- Controllo (20 min): eseguito per far riassetare il sistema prima di procedere eventualmente con una nuova acquisizione (ripetendo quindi la terza fase).

La fase di acquisizione è stata svolta per diversi passi incrementali del LivePa. In particolare, sempre sulla base del precedente lavoro di tesi <sup>83</sup>, sono stati individuati tre passi incrementali ritenuti significativi per ogni tipologia di membrana: per la membrana in PET, sono stati testati i passi 3, 5 e 6, mentre per la membrana in PCL/Gel i passi 5, 6 e 7 (in quanto più elastica).

I valori di pressione sono stati acquisiti e visualizzati in funzione del tempo tramite il software *Digital Transducer Application* (Omega™), associato al sensore di pressione, impostando una frequenza di campionamento di 10 Hz.

### 2.2.2.3 Elaborazione dei dati

Dopo aver effettuato le misure di pressione, i dati ottenuti sono stati elaborati tramite il programma Excel © Microsoft 365. Per ogni fase, è stata calcolata la pressione media nell'intervallo di tempo considerato, e la relativa deviazione standard. Dopodiché, al termine di ogni misura per un determinato passo incrementale, è stato calcolato un valore detto *rapporto incrementale*, con la seguente formula:

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

dove:

- $r$  = rapporto incrementale.
- $P_{incr}$  = pressione media misurata in camera basale durante la fase di acquisizione (con pompa azionata e passo incrementale settato sul LivePa).

- $P_{\text{controllo}}$  = pressione media misurata in camera basale durante la fase di controllo (con la sola pompa azionata).
- $P_{\text{statico}}$  = pressione media misurata in camera basale durante la fase in statico.

Il rapporto incrementale è dunque un indice di quante volte aumenta la pressione in camera basale in seguito all'ostruzione del tubo di uscita, rispetto al controllo. I due valori di pressione, prima di essere rapportati tra loro, vengono epurati dal contributo dato dall'inerzia del sistema (sottraendo il valore di pressione misurato in statico), in modo da osservare esclusivamente l'effetto della strizione del tubo <sup>83</sup>.

#### 2.2.2.4 Analisi statistica

Per avere un dataset di misure statisticamente valido, sono state effettuate almeno tre misure per ciascun passo incrementale applicato (sia per la membrana in PET, sia per quella in PCL/Gel). L'analisi statistica dei dati è stata eseguita con il software GraphPad © 2023.

### 2.2.3 Test cellulari

I test cellulari sono stati effettuati seminando le cellule (A549 e HuLEC-5A) sulle superfici della membrana in PCL/Gel, in modo da valutare l'adesione e il comportamento delle cellule in diverse condizioni sperimentali (statico, controllo e attuazione meccanica con il modulo LivePa). Per tutti gli esperimenti sono state impiegate cellule in passaggi di coltura compresi nel range P9-P12.

#### 2.2.3.1 Processo di sterilizzazione

Prima di ogni esperimento che prevedesse l'utilizzo delle cellule, sono state sterilizzate le varie parti del sistema, per evitare contaminazioni. Tutte le componenti del bioreattore, ad eccezione del *clamp system*, sono state sterilizzate in autoclave a 120 °C per 20 min. Al termine del processo, la membrana in PCL/Gel è stata alloggiata sull'*holder*, sistemata nel pozzetto di una piastra multiwell e trattata prima con 5 mL di etanolo diluito al 70%, e successivamente con una soluzione contenente 50 µL di antibiotico-antimicotico in 5 mL di tampone fosfato salino (*Phosphate Buffered Saline*, PBS). Questa soluzione è stata

lasciata agire *over-night*, dopodiché è stato effettuato un lavaggio in PBS prima di sterilizzare la membrana mediante raggi UV (20 min di esposizione per ciascun lato della membrana). Al termine delle procedure di sterilizzazione, sono state assemblate le varie parti del bioreattore.

### 2.2.3.2 Semina delle cellule HuLEC-5A in camera basale

Le cellule endoteliali da seminare in camera basale sono state prima mantenute in coltura con il loro mezzo specifico, costituito dal terreno MCDB 131 (Gibco™), più i seguenti supplementi (come indicato dal fornitore): siero fetale bovino (FBS) al 10%, antibiotico (Pen/Strep) all'1%, L-Glutammina (L-Glu) 10 mM, idrocortisone in concentrazione 1 µg/mL, e il fattore di crescita *Epidermal Growth Factor* (EGF) in concentrazione 10 ng/mL. Per indurre il distacco delle cellule dalla flask di coltura, è stato effettuato un lavaggio in PBS<sup>-</sup> (privato di calcio e magnesio) per eliminare i residui, dopodiché le cellule sono state trattate con 2 mL di tripsina, enzima in grado di distaccare le cellule dalla superficie cui hanno aderito. Per attivare la tripsina, la flask è stata tenuta in incubatore a 37 °C per 3 min, e in seguito sono stati aggiunti 5 mL del mezzo specifico per le cellule HuLEC-5A. Dopo aver raccolto tutto il volume così ottenuto, sono stati prelevati 10 µL di sospensione cellulare e depositati sugli appositi quadranti di un emocitometro, per eseguire la conta cellulare. Il numero totale di cellule contenute nel volume iniziale ( $N$ ) è stato ottenuto mediante la seguente formula:

$$N = \frac{n_c}{4} \cdot V \cdot 10\,000$$

dove  $n_c$  è il numero di cellule contate nei 4 quadranti dell'emocitometro,  $V$  è il volume della sospensione cellulare iniziale, e 10 000 è un fattore moltiplicativo necessario per ottenere una stima corretta del numero totale di cellule.

Dopodiché è stato calcolato il numero di cellule da seminare sulla superficie della membrana, e quindi il corrispondente volume di sospensione da prelevare (a partire dal numero totale di cellule calcolato in precedenza), considerando un'area di semina disponibile in camera basale di 1.8 cm<sup>2</sup>, e una densità cellulare da ottenere di 160 000 cellule/cm<sup>2</sup>. Una volta prelevato il volume desiderato, le cellule sono state isolate mediante centrifugazione a 1000 rpm per 8 min, a T ambiente. Il surnatante è stato rimosso per poter risospingere il pellet di cellule in 500 µL di mezzo di coltura. A questo punto, si è proceduto

alla semina delle cellule, iniettando la sospensione attraverso il tubo di ingresso della camera basale. Dopodiché sono stati aggiunti ulteriori 500  $\mu\text{L}$  di mezzo di coltura per riempire completamente la camera basale e minimizzare la formazione di bolle, che avrebbero potuto impedire una distribuzione omogenea delle cellule e ostacolarne l'adesione. Infine, il sistema è stato mantenuto in incubatore a 37 °C per 24 h, con la camera basale rivolta verso l'alto per facilitare l'adesione, permettendo alle cellule di raggiungere la superficie della membrana per effetto della gravità.

### 2.2.3.3 Test di adesione cellulare

Dopo aver seminato le cellule endoteliali (seguendo la procedura descritta in precedenza) e lasciato il bioreattore in incubatore a 37 °C per 24 h in condizioni statiche, è stata valutata l'adesione delle HuLEC-5A sulla membrana in PCL/Gel, osservando le cellule al microscopio a fluorescenza, dopo averle fissate e marcate con il DAPI, come descritto di seguito.

Al termine delle 24 h di incubazione, è stato prima di tutto rimosso il mezzo di coltura dalla camera basale, per poi effettuare un lavaggio in PBS (per eliminare i residui del mezzo). Quindi le cellule sono state trattate con una soluzione di paraformaldeide al 4% in PBS (PFA), lasciandola agire per 30 min a T ambiente per poter fissare le cellule. Dopodiché la PFA è stata rimossa, e i residui eliminati con un lavaggio in PBS.

In seguito, dopo aver disassemblato il bioreattore, la membrana (ancora alloggiata sull'*holder*) è stata sistemata nel pozzetto di una piastra multiwell, in modo da poter trattare le cellule adese con 4 mL di una soluzione di Triton X-100 allo 0.5% in PBS, al fine di aumentare la permeabilità della membrana cellulare e facilitare il successivo ingresso delle molecole di colorante. La soluzione è stata lasciata agire per 10 min, prima di effettuare un lavaggio di 5 min in PBS per rimuovere il Triton X-100 in eccesso.

Successivamente, è stata preparata una soluzione di albumina sierica bovina (*Bovine Serum Albumin*, BSA) all'1% [w/V] in PBS (di seguito nominata "BSA 1%"). Questa è stata utilizzata a sua volta per preparare una soluzione di falloidina in BSA 1%, in un rapporto di 1:60. La membrana è stata trattata (dal lato in cui sono state seminate le cellule) con 150  $\mu\text{L}$  di questa soluzione, per poter marcare i filamenti di F-actina del citoscheletro. Il campione è stato incubato per 20 min, prima di effettuare un lavaggio di 5 min in PBS per rimuovere la soluzione in eccesso.

Infine, la membrana è stata trattata con 150  $\mu$ L di una soluzione di DAPI in PBS, in rapporto 1:1000, al fine di marcare i nuclei delle cellule. La soluzione è stata lasciata agire per 5 min, prima di effettuare nuovamente un lavaggio in PBS.

Dopo aver sistemato la membrana (privata dell'*holder*) su un apposito vetrino coprioggetti, le cellule sono state osservate al microscopio in fluorescenza (ZOE<sup>TM</sup> *Fluorescent Cell Imager*), per valutarne qualitativamente l'adesione e distribuzione sulla membrana.

#### 2.2.3.4 Semina delle cellule A549 in camera apicale

Per i successivi esperimenti è stato necessario seminare sia le cellule endoteliali in camera basale, sia le A549 in quella apicale, al fine di realizzare una barriera più simile a quella fisiologica. In particolare, 24 h dopo aver seminato le HuLEC-5A, è stato prima effettuato il cambio del mezzo in camera basale, per poi procedere con la semina delle cellule epiteliali sulla superficie superiore della membrana. Per questo passaggio si è seguita la stessa procedura descritta in precedenza, ma utilizzando il mezzo di coltura specifico per le cellule A549, costituito dal terreno RPMI 1640 (Gibco<sup>TM</sup>), più i seguenti supplementi (come indicato dal fornitore): FBS al 10%, antibiotico (Pen/Strep) all'1%, e L-Glu all'1%. Per calcolare il numero di cellule da seminare sulla superficie superiore della membrana, è stata considerata un'area di semina di 1.8  $\text{cm}^2$ , e una densità cellulare di 140 000 cellule/ $\text{cm}^2$ .

A differenza di quanto fatto per le HuLEC-5A, in questo caso è stato possibile accedere direttamente alla camera apicale rimuovendo il tappo della porta d'accesso, per cui la semina delle A549 è stata effettuata depositando 500  $\mu$ L di sospensione dall'alto sulla superficie superiore della membrana. Dopo aver seminato le cellule, il sistema è stato inserito in incubatore a 37 °C, e mantenuto per il tempo necessario all'esperimento.

#### 2.2.3.5 Colture cellulari all'interno del bioreattore

Le cellule sono state mantenute in coltura all'interno del bioreattore, al fine di poterne valutare il comportamento in seguito all'applicazione di stimoli diversi. In particolare, sono state testate due condizioni sperimentali: ambiente dinamico caratterizzato dal solo flusso del mezzo di coltura, e attuazione meccanica realizzata con il LivePa.

Per ogni esperimento, dopo aver seminato le cellule endoteliali ed epiteliali ai due lati della membrana, il sistema è stato mantenuto in incubatore a 37 °C in condizioni di interfaccia liquido-liquido (LLI) per 72 h.

In seguito, il mezzo di coltura in camera apicale è stato rimosso per realizzare l'interfaccia aria-liquido, mentre quello in camera basale è stato cambiato con mezzo fresco. Prima di iniziare i test in condizioni dinamiche, è stato innanzi tutto predisposto il circuito fluidico da collegare al bioreattore, previa sterilizzazione in autoclave (120 °C per 20 min) delle componenti che sarebbero andate a contatto con il mezzo di coltura, ovvero reservoir, tubi in silicone e testa pompante. Il reservoir è stato quindi riempito con 10 mL di mezzo di coltura specifico per le HuLEC-5A, e collegato alla testa pompante, al fine di riempire i tubi del circuito mediante l'utilizzo della pompa peristaltica e minimizzare la formazione di bolle d'aria. Dopodiché, il bioreattore è stato collegato al circuito (in corrispondenza della sola camera basale) e inserito in incubatore. Nell'esperimento caratterizzato dal solo flusso del mezzo di coltura, è stata azionata la pompa LiveFlow, impostando una portata di 200 µL/min. Nel secondo esperimento, invece, oltre la pompa peristaltica è stato azionato anche il LivePa, andando a comprimere il tubo in uscita dalla camera basale, con passo incrementale 7 (identificato come il più significativo in quanto si è osservato un aumento della pressione fino a quel passo).

Il sistema è stato mantenuto all'interno dell'incubatore per 7 giorni, prima di procedere con il fissaggio e la marcatura mediante la tecnica dell'immunofluorescenza, seguendo il protocollo descritto di seguito.

### 2.2.3.6 Immunofluorescenza

Dopo 7 giorni di coltura all'interno del bioreattore, il mezzo in camera basale è stato rimosso, per poi effettuare un lavaggio in PBS. Dopodiché le cellule, sia in camera basale che in quella apicale, sono state prima fissate mediante PFA al 4% in PBS, lasciata agire per 30 min a T ambiente, e in seguito trattate con una soluzione di Triton X-100 allo 0.2 % in PBS per 10 min. Dopo un ulteriore lavaggio di 5 min in PBS, il campione, ancora all'interno del bioreattore, è stato incubato per 1 h con una soluzione di BSA al 2% [w/V] in PBS, per bloccare i siti aspecifici a cui si sarebbero potuti legare gli anticorpi primari.

A questo punto il bioreattore è stato disassemblato, e la membrana (ancora alloggiata sull'*holder*) sistemata nel pozzetto di una piastra multiwell, per procedere con

l'incubazione con gli anticorpi primari. L'obiettivo di questa fase era quello di marcare proteine come CD31, una molecola che viene tipicamente espressa dalle cellule endoteliali, ed E-caderina, molecola di adesione responsabile della formazione di giunzioni aderenti tra cellule epiteliali. Inizialmente è stata quindi preparata una soluzione di BSA all'1% [w/V] in PBS, alla quale è stato poi aggiunto Tween<sup>®</sup> 20 allo 0.1% [V/V] (soluzione finale di seguito denominata "BSA-Tween 20"). In seguito, ciascun lato della membrana è stato trattato con 150 µL di una soluzione contenente gli anticorpi primari anti-CD31 (in rapporto 1:500) e anti-E-caderina (in concentrazione 1 µg/mL) in BSA-Tween 20. Il campione è stato incubato con gli anticorpi primari *over-night* a 4 °C. Dopodiché, è stato effettuato un lavaggio di 5 min in BSA-Tween 20 (per rimuovere l'eccesso di anticorpo primario), prima di incubare con gli anticorpi secondari: a questo scopo ciascun lato della membrana è stato trattato con 150 µL di una soluzione contenente gli anticorpi anti-*mouse* e anti-*rabbit* in BSA-Tween 20, entrambi in rapporto 1:500. Il campione è stato incubato con gli anticorpi secondari e mantenuto in una piattaforma basculante per 2 h a T ambiente.

Dopo un ulteriore lavaggio di 5 min in BSA-Tween 20, la membrana è stata trattata da entrambi i lati con 150 µL di una soluzione contenente falloidina in BSA-Tween 20, in rapporto 1:60. Il campione è stato incubato per 20 min, prima di effettuare un lavaggio di 5 min in PBS. Infine, lo stesso procedimento è stato effettuato con una soluzione di DAPI in PBS, in rapporto 1:1000, ma lasciandola agire per 5 min, prima di effettuare nuovamente un lavaggio in PBS.

Dopo aver sistemato la membrana (privata dell'*holder*) su un apposito vetrino coprioggetti, il campione è stato osservato al microscopio confocale, per visualizzare i nuclei cellulari, i filamenti di F-actina e le eventuali giunzioni formate dalle cellule.

La procedura è stata ripetuta allo stesso modo per entrambi gli esperimenti descritti nel paragrafo precedente.

### 2.2.3.7 Colture cellulari in inserti Transwell<sup>®</sup>

Per valutare il comportamento delle cellule in condizioni statiche, sono stati utilizzati degli inserti Transwell<sup>®</sup> (esperimento eseguito in duplicato), opportunamente modificati alloggiando le membrane in PCL/Gel al posto di quelle commerciali.

Per prima cosa, si è seguito il protocollo di sterilizzazione già descritto in precedenza per la membrana alloggiata sull'*holder*, per cui le Transwell<sup>®</sup> sono state sistemate all'interno

dei pozzetti di una piastra multiwell, e trattate prima con etanolo, poi con la soluzione di antibiotico-antimicotico, e infine con raggi UV. Dopo la sterilizzazione, i pozzetti sono stati parzialmente riempiti con PBS per mantenere un ambiente umido, più favorevole alla successiva adesione cellulare.

In seguito, si è proceduto a seminare le cellule HuLEC-5A sulla superficie inferiore delle membrane. È stato seguito lo stesso protocollo descritto per il bioreattore, considerando sempre una densità cellulare di 160 000 cellule/cm<sup>2</sup>, ma un'area di semina di 1.1 cm<sup>2</sup>. Una volta risospese le cellule in 50 µL di mezzo di coltura per ogni Transwell<sup>®</sup>, la sospensione è stata depositata goccia a goccia sulla superficie. La piastra multiwell è stata mantenuta in incubatore a 37 °C per 4 h, per consentire alle cellule di aderire alla membrana, prima di rimuovere il PBS, capovolgere le Transwell<sup>®</sup> e riempire il fondo dei pozzetti con 1 mL di mezzo di coltura. In questo modo è stato possibile mantenere solo la superficie inferiore a contatto con il mezzo delle endoteliali.

Dopo 24 h di incubazione, è stato effettuato il cambio del mezzo nel compartimento basale, dopodiché sono state seminate le cellule A549 sulla superficie superiore, sempre seguendo il protocollo descritto, considerando una densità di 140 000 cellule/cm<sup>2</sup>, e un'area di semina di 1.1 cm<sup>2</sup>. Dopo aver depositato 300 µL di sospensione di cellule epiteliali sulla superficie di ciascuna membrana, la piastra è stata inserita in incubatore a 37 °C, e mantenuta in condizioni LLI per 72 h.

A questo punto il mezzo di coltura nel compartimento apicale è stato rimosso per realizzare l'interfaccia aria-liquido, mentre quello delle cellule endoteliali è stato sostituito con 600 µL di mezzo fresco. I campioni sono stati nuovamente inseriti in incubatore, e mantenuti in condizioni statiche per 7 giorni (cambiando il mezzo di coltura delle HuLEC-5A ogni 2 giorni). Infine, dopo aver applicato il protocollo di immunofluorescenza descritto in precedenza, i campioni sono stati osservati al microscopio confocale.

## CAPITOLO 3: RISULTATI E DISCUSSIONE

### 3.1 Misurazioni di pressione

Per ogni tipologia di membrana, sono stati confrontati i valori dei rapporti incrementali ottenuti per ciascun passo incrementale applicato con il LivePa. Inoltre, poiché tutte le acquisizioni effettuate in questo studio sono state svolte utilizzando il sistema in condizioni ALI, i risultati sono stati confrontati anche con quelli ottenuti nel precedente lavoro di tesi<sup>83</sup>, che prevedeva la caratterizzazione del sistema in condizioni LLI.

#### 3.1.1 Misurazioni con membrana in PET

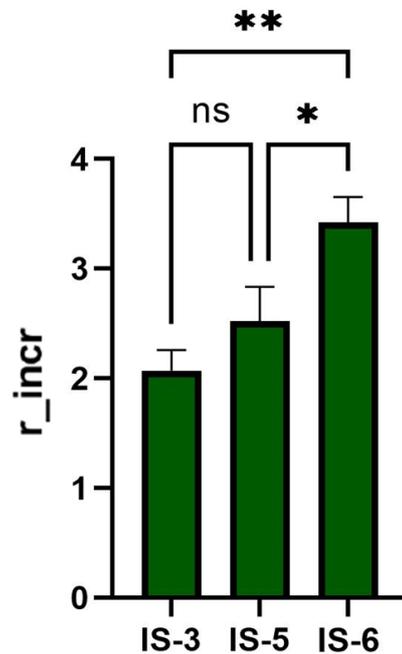
Per le misurazioni effettuate con la membrana commerciale in PET a separare le due camere, sono stati testati i passi incrementali 3, 5 e 6, considerati più rilevanti in base ai risultati emersi dallo studio precedente. Il passo 2 non è stato preso in considerazione poiché in condizioni LLI si è osservato un andamento della pressione molto simile al passo 3<sup>83</sup>.

I risultati ottenuti hanno mostrato un aumento del rapporto incrementale all'aumentare del grado di occlusione del tubo in uscita dalla camera basale, per cui la sovrappressione generata dall'applicazione della stimolazione meccanica diventa maggiormente rilevante per passi incrementali più elevati. Nella tabella seguente sono riportati i valori medi dei rapporti incrementali ottenuti per ciascun passo:

	<b>Rapporto incrementale (media ± dev. std)</b>	
<b>Passo incrementale</b>	<b>IS-3</b>	2.07 ± 0.19
	<b>IS-5</b>	2.52 ± 0.31
	<b>IS-6</b>	3.42 ± 0.23

*Tabella 1: Valori medi dei rapporti incrementali ottenuti per i passi testati con la membrana in PET (IS-3, IS-5 e IS-6).*

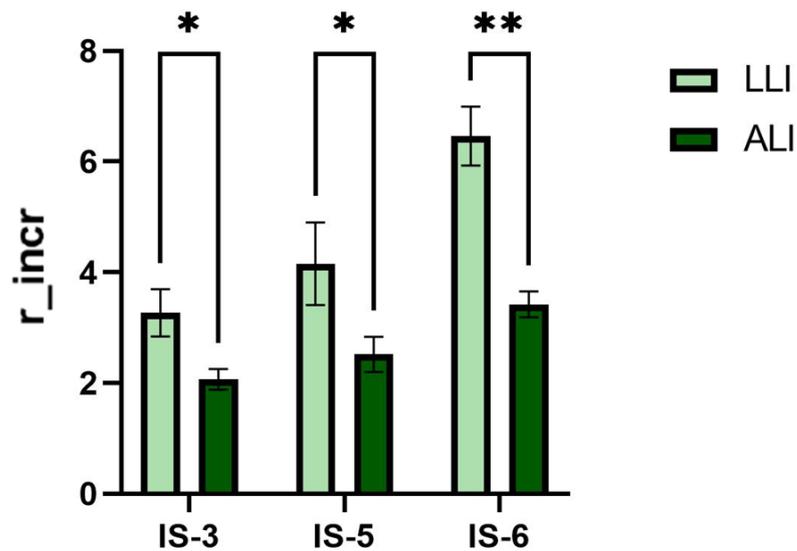
Tuttavia, dall'analisi statistica effettuata, non è emersa una differenza statisticamente significativa tra i passi 3 e 5, differenza che invece si può osservare tra il passo 6 e i precedenti (più marcata tra i passi 3 e 6), come mostrato in Fig. 26.



**Figura 26:** Analisi statistica dei rapporti incrementali ottenuti per i passi testati con la membrana in PET (IS-3, IS-5 e IS-6). ns = non significativo; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.005$ , \*\*\*  $p < 0.0005$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

Confrontando i rapporti incrementali ottenuti in condizioni ALI con quelli riportati per il sistema in condizioni LLI<sup>83</sup>, in corrispondenza degli stessi passi incrementali, è possibile apprezzare una differenza significativa per tutti i passi presi in considerazione, in misura maggiore per il passo 6 (Fig. 27), pur mantenendo un andamento simile.

In tutti e tre i casi, i valori ottenuti in condizioni ALI risultano più bassi rispetto a quanto osservato in condizioni LLI. Questo può essere dovuto al fatto che, in condizioni ALI, la membrana potrebbe aver subito una deformazione superiore, a causa della presenza di aria (più comprimibile dell'acqua) in camera apicale. Una maggiore deformazione della membrana, avvenuta in seguito all'applicazione del passo incrementale, corrisponderebbe a un maggiore incremento di volume in camera basale, e quindi a un minore incremento di pressione nel passaggio dal controllo alla fase di attuazione (attivazione del LivePa), considerando pressione e volume inversamente proporzionali tra loro.



**Figura 27:** Analisi statistica dei rapporti incrementali ottenuti con la membrana PET in condizioni ALI e LLI, per i passi incrementali testati (IS-3, IS-5 e IS-6). ns = non significativo; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.005$ , \*\*\*  $p < 0.0005$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

### 3.1.2 Misurazioni con membrana in PCL/Gel

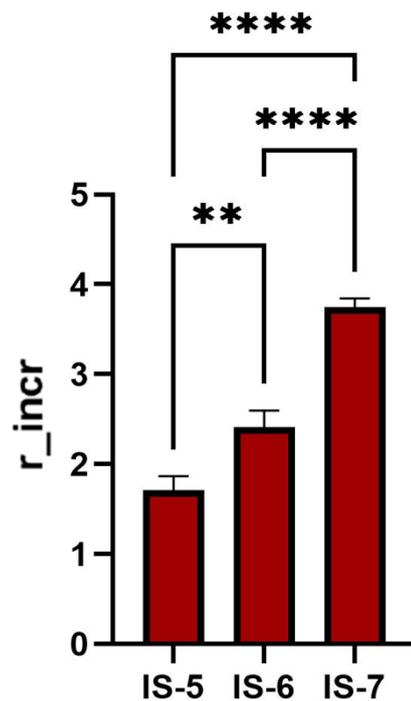
Per le acquisizioni effettuate con la membrana in PCL/Gel, sono stati considerati i passi incrementali 5, 6 e 7, corrispondenti a quelli testati nel lavoro precedente. I passi presi in considerazione sono maggiori rispetto a quelli valutati con la membrana in PET poiché, essendo la membrana in PCL/Gel più elastica, si deforma più facilmente, tanto che in condizioni LLI non è stato osservato un incremento di pressione rilevante per i passi inferiori<sup>83</sup>. Anche in questo caso è stato riscontrato un aumento nel valore del rapporto incrementale all'aumentare del grado di occlusione. In Tabella 2 sono riportati i valori medi ottenuti per i tre passi incrementali testati:

Passo incrementale	Rapporto incrementale (media $\pm$ dev. std)	
	IS-5	1.71 $\pm$ 0.16
IS-6	2.41 $\pm$ 0.19	
IS-7	3.74 $\pm$ 0.10	

**Tabella 2:** Valori medi dei rapporti incrementali ottenuti per i passi testati con la membrana in PCL/Gel (IS-5, IS-6 e IS-7).

In generale, i risultati hanno mostrato come il sistema, probabilmente a causa della maggiore elasticità della membrana in PCL/Gel, sia in grado di percepire una stimolazione paragonabile a quella che si avrebbe con la membrana in PET con 1-2 passi incrementali in meno, in maniera simile a quanto osservato in condizioni LLI<sup>83</sup>.

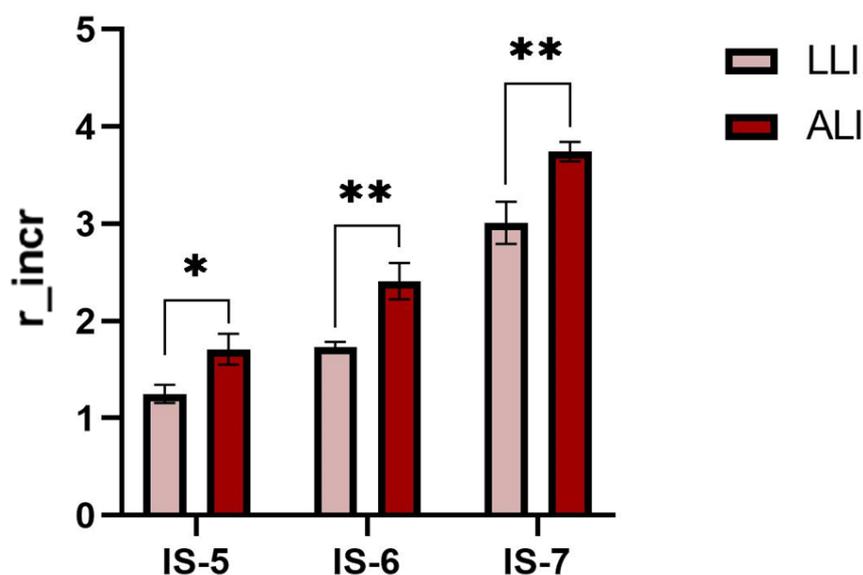
A differenza di quanto riportato per la membrana commerciale, in questo caso l'analisi statistica ha rivelato una differenza significativa anche tra i primi due passi testati (5 e 6), mentre tra il passo 7 e i precedenti la differenza diventa molto più marcata (Fig. 28).



**Figura 28:** Analisi statistica dei rapporti incrementali ottenuti per i passi testati con la membrana in PCL/Gel (IS-5, IS-6 e IS-7). ns = non significativo; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.005$ , \*\*\*  $p < 0.0005$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

Questo confronto con i risultati ottenuti con la membrana in PET conferma quanto emerso dallo studio precedente in condizioni LLI, ovvero il fatto che la membrana in PCL/Gel sembra conferire al sistema una maggiore sensibilità ad eventuali variazioni delle sollecitazioni esterne, comportamento che si può ritenere più simile a quello della barriera alveolo-capillare fisiologica<sup>83</sup>. Viste le considerazioni fatte in precedenza sulla maggiore elasticità della membrana in PCL/Gel, il confronto è da ritenere valido nonostante i passi incrementali testati non siano gli stessi.

Come già effettuato per la membrana in PET, anche in questo caso sono stati confrontati i valori ottenuti in condizioni ALI con quelli riportati in condizioni LLI <sup>83</sup>, ed è stata osservata ancora una differenza significativa per tutti i passi presi in considerazione, in particolar modo per i passi 6 e 7 (Fig. 29).



**Figura 29:** Analisi statistica dei rapporti incrementali ottenuti con la membrana PCL/Gel in condizioni ALI e LLI, per i passi incrementali testati (IS-5, IS-6 e IS-7). ns = non significativo; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.005$ , \*\*\*  $p < 0.0005$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

Tuttavia, in questo caso, si è verificata una situazione opposta a quella precedente, dal momento che i rapporti incrementali sono risultati più elevati di quelli calcolati in condizioni LLI. Questo potrebbe essere spiegato tenendo conto delle differenze tra i valori assoluti di pressione, sia nel passaggio dalla condizione in statico al controllo, sia dal controllo alla fase di attuazione. In condizioni ALI, l'elasticità della membrana in PCL/Gel potrebbe aver provocato una maggiore deformazione (e quindi un minore incremento pressorio) non solo dopo l'attivazione del LivePa, ma anche nel passaggio dallo statico al controllo. In condizioni LLI, invece, a causa della presenza di acqua in camera apicale, la membrana potrebbe aver incontrato inizialmente una resistenza superiore, per poi mostrare una deformazione maggiore solo nella fase successiva (passaggio dal controllo all'attuatore). Infatti, analizzando i valori assoluti di pressione relativi al controllo, epurati dai rispettivi contributi in statico, si può notare come la media dei valori ottenuti in condizioni ALI

( $0.020 \pm 0.008$  kPa) sia decisamente inferiore a quella ricavata dallo studio precedente <sup>83</sup> ( $0.083 \pm 0.053$  kPa). La minore differenza di pressione tra controllo e statico in condizioni ALI potrebbe quindi spiegare l'ottenimento di rapporti incrementali perfino più alti di quelli osservati in condizioni LLI.

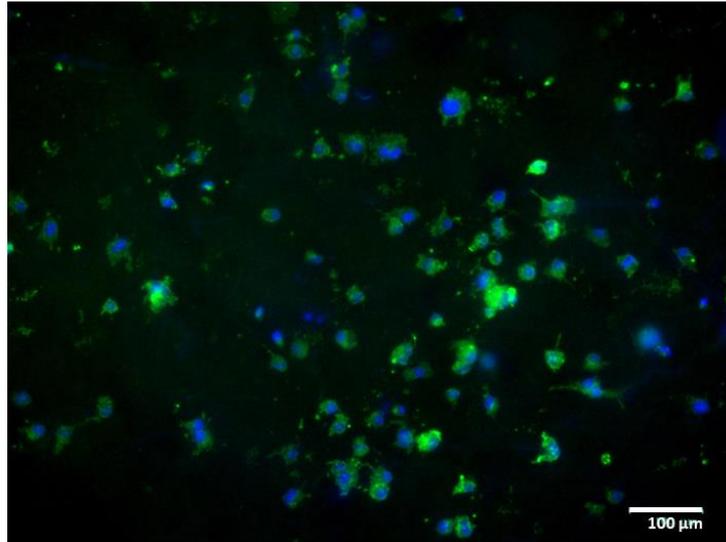
## 3.2 Test cellulari

In questa sezione viene riportato e discusso quanto osservato in seguito agli esperimenti condotti utilizzando le cellule HuLEC-5A e A549, seminate sulla membrana in PCL/Gel e coltivate in diverse condizioni sperimentali. In questo modo è stato possibile valutare qualitativamente come ciascuno stimolo applicato possa influenzare il comportamento cellulare.

### 3.2.1 Test di adesione

Prima di tutto, è stato svolto un test preliminare per valutare l'adesione delle sole cellule HuLEC-5A, poiché questo fenotipo presenta in genere una maggiore difficoltà a interagire con substrati come quello rappresentato dalla membrana in PCL/Gel. Osservando le cellule al microscopio in fluorescenza 24 h dopo la loro semina in camera basale, è stato possibile notare come queste fossero adese e ben distribuite su tutta la superficie della membrana (Fig. 30). Si può quindi affermare che la modalità di semina impiegata favorisca una buona adesione e una distribuzione uniforme delle cellule, caratteristica molto importante per garantire la successiva vitalità e proliferazione cellulare, e l'eventuale espressione di marker specifici.

Tuttavia, l'osservazione dei filamenti del citoscheletro suggerisce come le cellule abbiano mantenuto una forma tondeggianti, senza appiattirsi sul substrato, probabilmente per via del fatto che il tempo dell'esperimento non è stato sufficiente affinché le cellule andassero incontro al fenomeno di *spreading*.



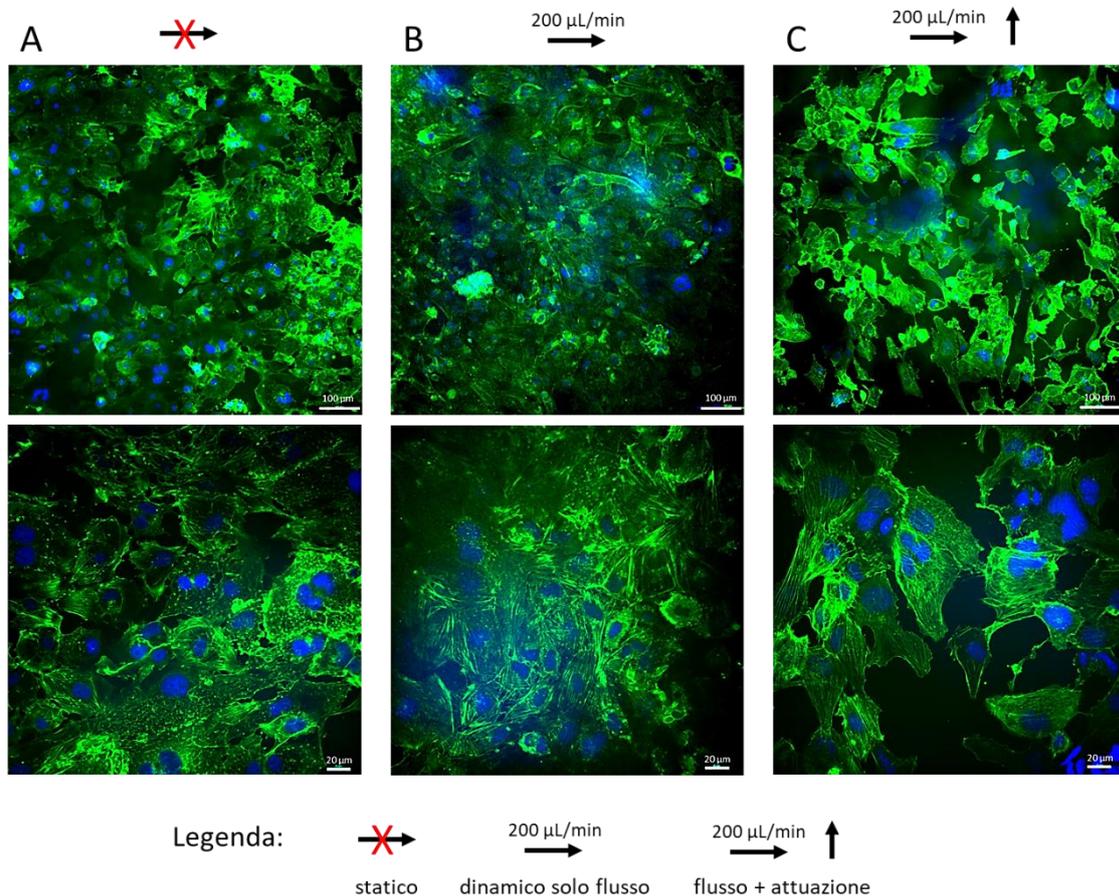
*Figura 30: Immagine in fluorescenza delle cellule HuLEC-5A 24h dopo la semina in camera basale. I nuclei sono stati marcati con il DAPI (blu), i filamenti di actina con la falloidina (verde).*

### **3.2.2 Colture cellulari in condizioni ALI**

Seguendo il protocollo descritto in precedenza per gli esperimenti condotti in inserti Transwell® e all'interno del bioreattore, la co-coltura delle cellule HuLEC-5A e A549 è stata mantenuta per 3 giorni in condizioni LLI, e successivamente 7 giorni in condizioni ALI. Dopodiché, i nuclei delle cellule sono stati marcati con il DAPI, e i filamenti di F-actina con la falloidina, per poter valutare l'adesione e la morfologia cellulare. Inoltre, mediante la tecnica dell'immunofluorescenza, è stato possibile valutare l'espressione di alcune proteine caratteristiche, in particolare E-caderina per le cellule epiteliali e CD31 per le endoteliali. Le diverse condizioni sperimentali (coltura statica in inserti Transwell®, dinamica con solo flusso a 200  $\mu\text{L}/\text{min}$  in camera basale e dinamica con flusso e attuazione meccanica) sono state confrontate osservando i campioni al microscopio confocale.

Innanzitutto, va sottolineato come, in tutte le condizioni testate, entrambe le tipologie di cellule abbiano mantenuto una buona adesione e distribuzione sulla membrana dopo la coltura in ALI. Considerando invece la morfologia cellulare, è emerso come gli stimoli applicati abbiano avuto un ruolo fondamentale nel rimodellamento del citoscheletro, modificando la struttura e l'orientamento delle cellule. Questo è risultato particolarmente evidente per le HuLEC-5A, che in condizioni statiche hanno mantenuto una forma poligonale, disponendosi in maniera casuale, senza un'orientazione preferenziale (Fig. 31a). In risposta alle sollecitazioni indotte dal solo flusso del mezzo, invece, le cellule

hanno assunto una forma allungata, in seguito alla riorganizzazione dei filamenti di actina (Fig. 31b). Il fenomeno si è rivelato ancora più accentuato in seguito all'applicazione della sovrappressione con il LivePa, indicando come le cellule in queste condizioni abbiano risentito maggiormente della deformazione subita dalla membrana (Fig. 31c).

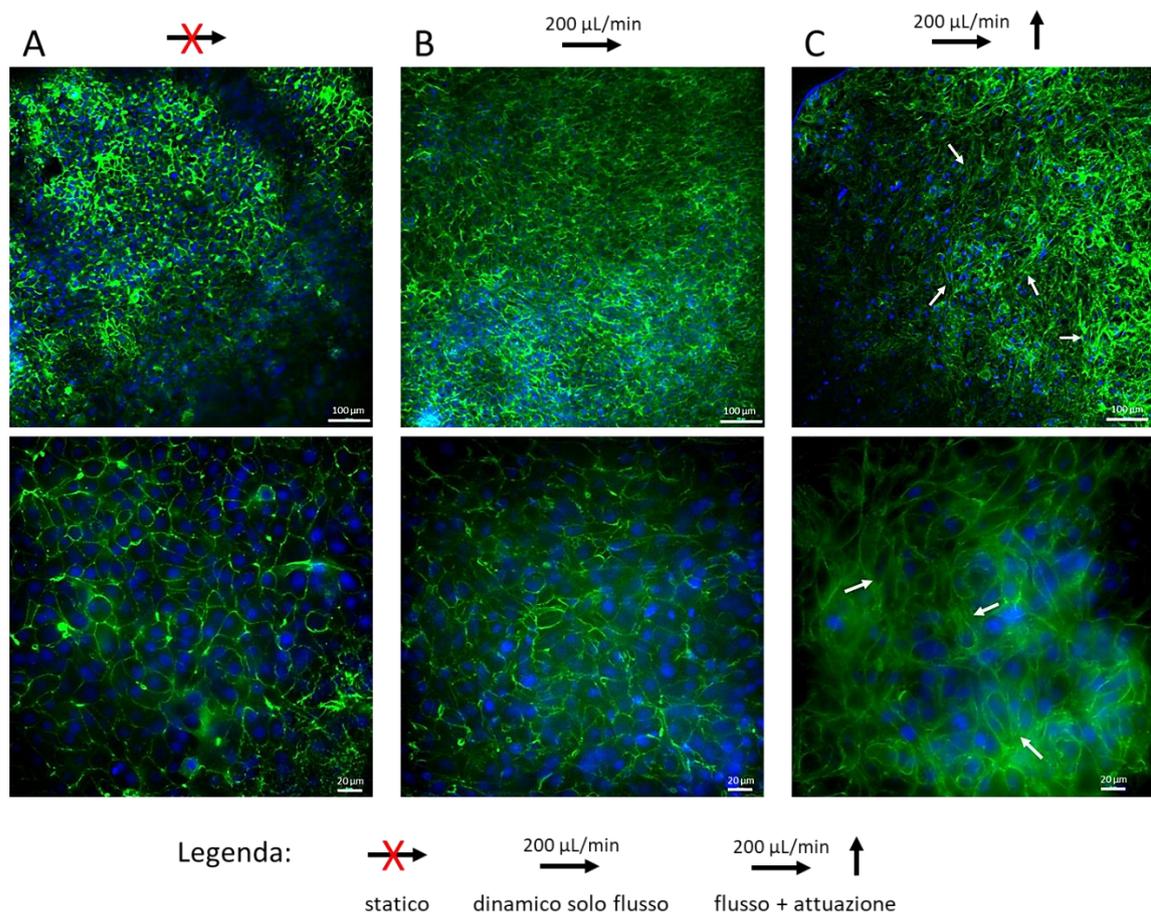


**Figura 31:** Immagini al microscopio confocale delle cellule HuLEC-5A dopo 7 giorni di coltura in ALL, in condizioni **A)** statiche (Transwell®), **B)** dinamiche con solo flusso (200  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) e **C)** dinamiche con flusso e attuazione meccanica (IS-7). I nuclei sono stati marcati con il DAPI (blu), i filamenti di actina con la falloidina (verde). Ingrandimenti: 20x, in alto (barra di scala: 100  $\mu\text{m}$ ) e 60x, in basso (barra di scala: 20  $\mu\text{m}$ ).

In particolare, osservando le immagini ad ingrandimento superiore, si può notare come i filamenti del citoscheletro si siano disposti in maniera tale da orientare le cellule in una direzione che sembra essere perpendicolare a quella del flusso. Dagli studi precedenti è emerso che, in presenza di una sollecitazione che tende a deformare le cellule, si formano dei fasci di filamenti di actina (noti come “fibre da stress”) che si orientano in direzione opposta a quella dello stimolo<sup>84-86</sup>. Si ritiene che l’orientazione perpendicolare assunta

dalle fibre serve a minimizzare le alterazioni nella struttura intracellulare, opponendo una certa resistenza allo sforzo applicato <sup>87</sup>. Tuttavia, è stato indagato anche l'effetto del solo sforzo di taglio che, al contrario, dovrebbe provocare l'allineamento delle cellule in direzione del flusso <sup>84,85</sup>. Alla luce di quanto riportato in letteratura, quindi, si potrebbe pensare che l'orientazione assunta dalle cellule in questo lavoro sia stata influenzata, più che dallo sforzo di taglio, dalla deformazione subita dalla membrana (che tuttavia non è stata valutata in maniera diretta) e trasmessa direttamente alle cellule.

Seppure in maniera meno marcata, anche per le A549 è stato possibile notare una diversa struttura cellulare in funzione dello stimolo applicato (Fig. 32): in particolare, le cellule epiteliali sembrano aver subito l'effetto dell'applicazione del passo incrementale, assumendo una forma più allungata rispetto a quanto osservato nelle altre condizioni (in particolare rispetto alla coltura statica, dove hanno mantenuto una forma tondeggiate).

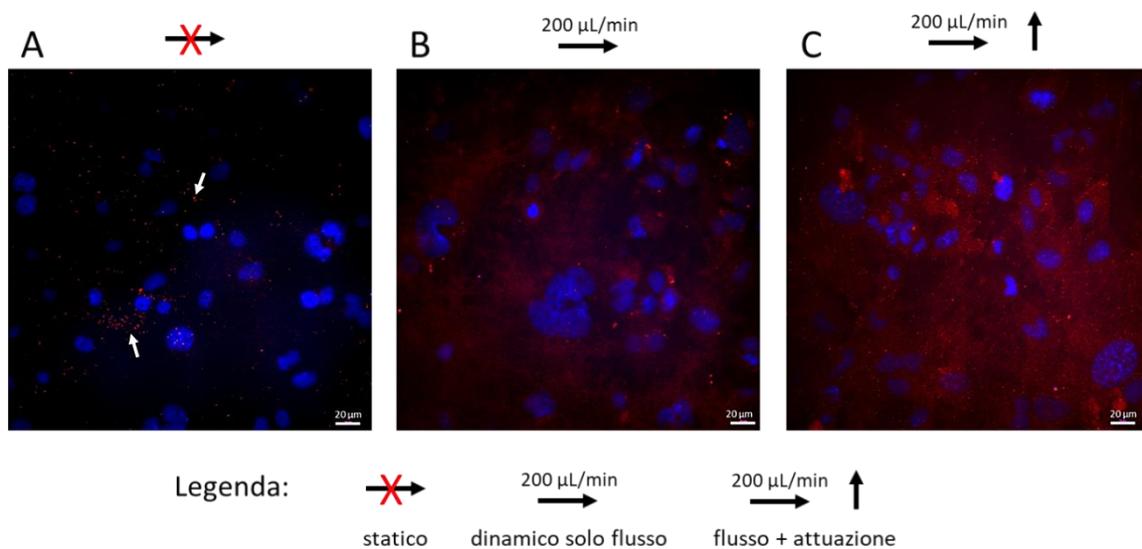


**Figura 32:** Immagini al microscopio confocale delle cellule A549 dopo 7 giorni di coltura in ALI, in condizioni **A)** statiche (Transwell<sup>®</sup>), **B)** dinamiche con solo flusso (200 µL/min) e **C)** dinamiche con flusso e attuazione meccanica (IS-7). I nuclei sono stati marcati con il DAPI (blu), i filamenti

di actina con la falloidina (verde). Le frecce bianche evidenziano alcuni punti in cui le cellule hanno assunto una forma più allungata. Ingrandimenti: 20x, in alto (barra di scala: 100  $\mu\text{m}$ ) e 60x, in basso (barra di scala: 20  $\mu\text{m}$ ).

Questo risultato è in accordo con quanto riportato da Man et al., che hanno mostrato come anche le cellule A549 assumano un'orientazione perpendicolare alla direzione di deformazione, ma siano comunque meno sensibili alla stimolazione rispetto alle cellule endoteliali <sup>88</sup>.

Anche l'espressione delle proteine E-caderina e CD31 è stata influenzata dalle condizioni di coltura. Per le cellule endoteliali è emersa, seppure in termini qualitativi, una produzione significativa di CD31 solamente in seguito all'attuazione meccanica, mentre in presenza di solo flusso è risultata piuttosto ridotta e in condizioni statiche è stata notata solo un'iniziale espressione della proteina (Fig. 33).

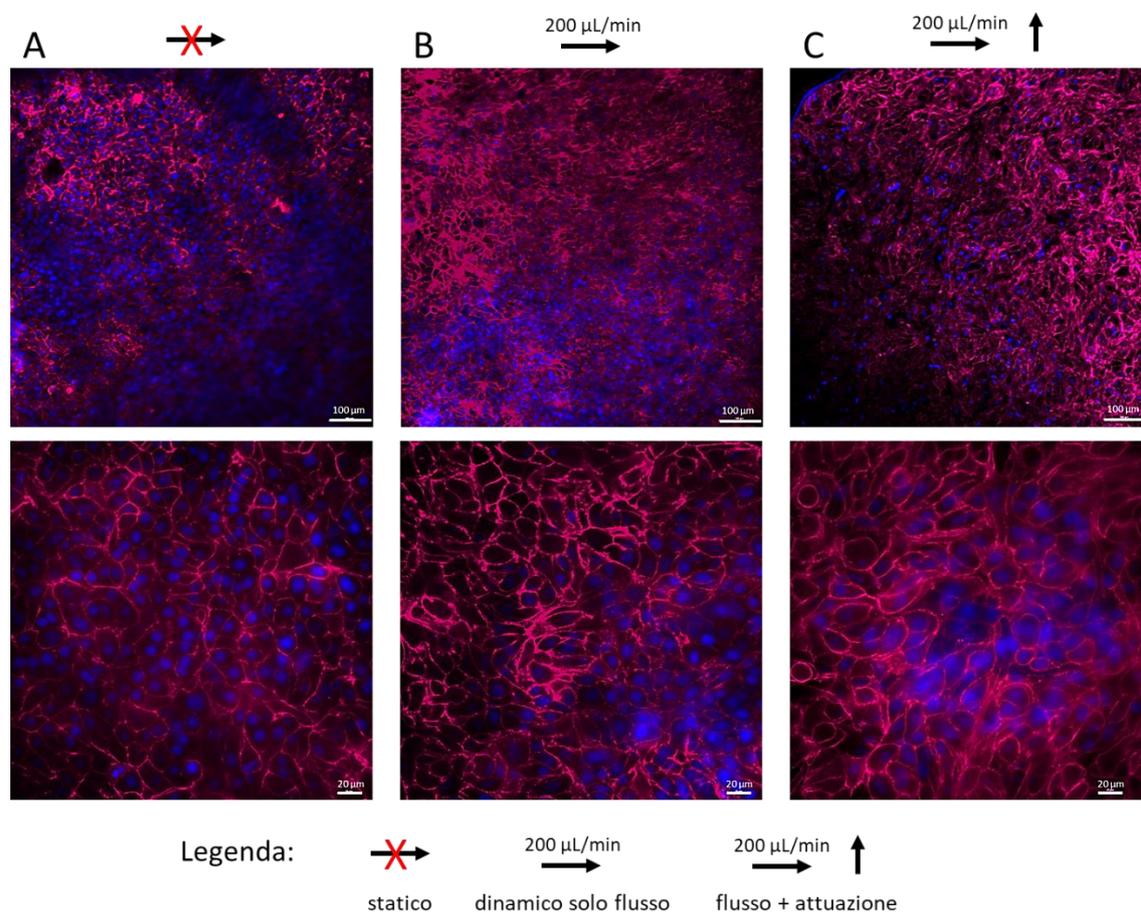


**Figura 33:** Immagini al microscopio confocale dell'espressione di CD31 dopo 7 giorni di coltura in ALI, in condizioni **A)** statiche (Transwell<sup>®</sup>), **B)** dinamiche con solo flusso (200  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) e **C)** dinamiche con flusso e attuazione meccanica (IS-7). I nuclei delle cellule HuLEC-5A sono stati marcati con il DAPI (blu), la proteina CD31 con anticorpo primario anti-CD31 e anticorpo secondario Alexa Fluor 555 (rosso). Ingrandimento 60x (barra di scala: 20  $\mu\text{m}$ ).

Il risultato osservato in questo esperimento è confermato anche dallo studio di Sharifpanah et al., i quali hanno riportato un incremento significativo di CD31 in seguito a stimolazione

meccanica statica (con una deformazione del 10%), dimostrando come questa fosse in grado di stimolare il processo di vasculogenesi <sup>89</sup>. Questi risultati possono essere spiegati anche tenendo conto del ruolo associato al CD31: si tratta infatti di una molecola coinvolta nelle fasi iniziali del processo di meccano-trasduzione, ed è in grado di percepire gli stimoli meccanici attivando una cascata di segnali che porta alla riorganizzazione della struttura cellulare <sup>87</sup>. Ci si può quindi aspettare che, in presenza di una stimolazione come quella applicata in questo lavoro, la sua produzione aumenti.

Per quanto riguarda le cellule epiteliali, invece, anche nelle colture in Transwell<sup>®</sup> è stato possibile notare l'espressione di E-caderina (Fig. 34a). Tuttavia, l'attivazione del flusso (Fig. 34b) e l'applicazione del passo incrementale (Fig. 34c), sembrano aver stimolato una maggiore formazione di giunzioni aderenti.



**Figura 34:** Immagini al microscopio confocale dell'espressione di E-caderina dopo 7 giorni di coltura in ALI, in condizioni **A)** statiche (Transwell<sup>®</sup>), **B)** dinamiche con solo flusso (200 μL/min) e **C)** dinamiche con flusso e attuazione meccanica (IS-7). I nuclei delle cellule A549 sono stati marcati con il DAPI (blu), la proteina E-caderina con anticorpo primario anti-E-caderina e

*anticorpo secondario Cyan5 (magenta). Ingrandimenti: 20x, in alto (barra di scala: 100  $\mu\text{m}$ ) e 60x, in basso (barra di scala: 20  $\mu\text{m}$ ).*

In particolare, l'incremento è risultato maggiormente visibile nel confronto tra condizione statica e dinamica con solo flusso. In ogni caso, l'applicazione della sovrappressione non sembra aver compromesso, almeno a livello qualitativo, l'integrità della barriera. Alcuni studi hanno riportato come la proteina E-caderina abbia un ruolo importante nel recepire le forze meccaniche agenti sul tessuto, e nel convertire queste forze in risposte cellulari che determinano la riorganizzazione del citoscheletro, ma anche il rafforzamento dell'adesione stessa tra le cellule <sup>90,91</sup>. Tuttavia, in alcuni casi, l'espressione di E-caderina può venire ridotta in seguito alla deformazione meccanica <sup>92</sup>. In generale, anche per altre tipologie di giunzioni sviluppate dalle cellule epiteliali, è stato osservato come il flusso del mezzo e la stimolazione meccanica fisiologica possano incrementare la formazione di giunzioni, mentre una stimolazione non fisiologica compromette l'integrità della barriera <sup>40,52</sup>. Gli stimoli applicati in questo lavoro potrebbero quindi essere adatti allo sviluppo di una barriera epiteliale funzionale, più simile a quella fisiologica.

## CAPITOLO 4: CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI

La necessità di comprendere meglio i meccanismi alla base di determinate patologie polmonari, indagare gli effetti avversi causati dall'inalazione di agenti nocivi, e sviluppare nuovi approcci terapeutici, ha portato allo sviluppo di modelli *in vitro* sempre più avanzati, in grado di mimare il più possibile l'ambiente fisiologico e le condizioni presenti *in vivo*.

In particolare, i bioreattori rappresentano strumenti molto utili per realizzare modelli di barriera alveolo-capillare. Questi sistemi consentono la coltura cellulare in condizioni dinamiche e offrono inoltre la possibilità di applicare stimoli specifici, fisiologici o patologici, per poter valutare il loro effetto sul comportamento cellulare.

Il bioreattore bi-compartmentale LiveBox2, utilizzato in questo lavoro di tesi, ha permesso lo sviluppo di un modello di barriera alveolo-capillare in condizioni di interfaccia aria-liquido, più rappresentativa delle condizioni fisiologiche. La calibrazione del sistema con il LivePa ha permesso di valutare il comportamento della membrana in PCL/Gel, ottenuta mediante electrospinning, in seguito all'applicazione di una sovrappressione statica in camera basale, e di confrontarlo con quello assunto dalla membrana commerciale in PET. Monitorando la pressione all'interno della camera basale, è stato osservato per entrambe le membrane un andamento simile del rapporto incrementale, che ha mostrato un aumento all'aumentare del grado di occlusione del tubo di uscita. Tuttavia, a parità di passo applicato, con la membrana in PCL/Gel si sono ottenuti valori di rapporto incrementale più bassi, a testimonianza della maggiore elasticità di questa membrana rispetto a quella commerciale. Un minore incremento di pressione, infatti, può essere indice di una maggiore deformazione subita dalla membrana.

Il monitoraggio della pressione in funzione dell'attuazione meccanica è stato condotto anche con lo scopo di applicare, durante la successiva coltura cellulare, una pressione nota al sistema, per poter prevedere gli sforzi cui sarebbero state sottoposte le cellule, e associare la risposta cellulare a uno stimolo specifico.

I test cellulari hanno messo in evidenza come la membrana in PCL/Gel rappresenti un substrato favorevole all'adesione e sopravvivenza di entrambe le tipologie di cellule coltivate (A549 e HuLEC-5A). Queste si sono distribuite uniformemente sulle loro rispettive superfici di semina e, inoltre, il loro comportamento è stato influenzato dagli stimoli applicati. In particolare, nelle HuLEC-5A questi stimoli hanno portato a una

riorganizzazione dei filamenti del citoscheletro, facendo assumere alle cellule una forma allungata, probabilmente per opporsi alle sollecitazioni derivate dalla deformazione della membrana. È stato interessante notare come anche le A549 abbiano risposto in particolar modo all'applicazione della sovrappressione con il LivePa, orientandosi in maniera simile alle cellule endoteliali. Nelle altre condizioni, invece, hanno mantenuto una forma più tondeggiante.

Anche l'espressione delle proteine CD31 ed E-caderina è stata influenzata dalle diverse condizioni di coltura. Per il CD31 è stata osservata un'espressione molto più marcata in seguito all'applicazione del passo incrementale, mentre l'incremento di giunzioni aderenti tra le cellule epiteliali è risultato più evidente nel confronto tra condizioni statiche e dinamiche con solo flusso.

In conclusione, i risultati ottenuti hanno mostrato come il bioreattore utilizzato sia un ottimo candidato per riprodurre in maniera affidabile *in vitro* una barriera alveolo-capillare in grado di simulare il movimento respiratorio, modello che potrebbe rivelarsi molto utile per studi più specifici e avanzati.

Il lavoro svolto in questa sede rappresenta uno studio ancora in una fase preliminare, che si presta a diversi sviluppi futuri. Si potrebbe innanzi tutto valutare la risposta cellulare in seguito all'applicazione di diversi gradi di sollecitazione, per cercare di capire quali stimoli permettano di ottenere effettivamente un modello fisiologico, piuttosto che uno patologico. Al fine di studiare meglio le funzionalità della barriera ottenuta, si potrebbero effettuare test di permeabilità, nei confronti di molecole specifiche o nanoparticelle, valutazioni quantitative sull'integrità della barriera (ad esempio misurazioni della TEER), o ancora studi sulle risposte cellulari in seguito all'esposizione ad agenti nocivi. Lo sviluppo di un modello patologico potrebbe essere utile per poi testare l'efficacia di determinati agenti terapeutici, ad esempio farmaci antinfiammatori.

Inoltre, l'introduzione di una stimolazione meccanica ciclica, in sostituzione di quella statica applicata in questo studio, consentirebbe di ottenere probabilmente un ambiente più simile a quello fisiologico, riproducendo più fedelmente gli stimoli agenti durante il ciclo respiratorio. Si potrebbe anche applicare un diverso tipo di stimolazione meccanica, ad esempio mediante un flusso d'aria in camera apicale, che vada a deformare ciclicamente la membrana, in modo da simulare meglio la dinamica del movimento respiratorio. Recenti studi effettuati su sistemi simili, come quello presentato da Nossa et al., hanno mostrato ad esempio la possibilità di collegare la camera apicale con un sistema ad aria compressa,

variando il grado di deformazione della membrana tramite un regolatore di pressione, per poter riprodurre diverse condizioni, fisiologiche o patologiche <sup>93</sup>.

Sempre al fine di ottenere un modello di barriera alveolo-capillare più accurato, si potrebbero realizzare co-culture di differenti tipi cellulari, che includano ad esempio, oltre alle cellule epiteliali ed endoteliali, anche fibroblasti polmonari e cellule immunitarie, valutando il loro effetto sulle proprietà della barriera.

Nell'ottica di sviluppare sistemi sempre più avanzati, si potrebbe poi partire da questo dispositivo per arrivare a realizzare modelli personalizzati, utilizzando cellule primarie umane per sviluppare approcci terapeutici specifici per un determinato paziente.

## RIFERIMENTI

- (1) Anastasi, G.; Capitani, S.; Carnazza, M. L.; Cinti, S.; de Caro, R.; Rosario, F. *Trattato Di Anatomia Umana*, 4th ed.; Edi Ermes, 2007; Vol. 2.
- (2) Edwards, Y. S. Stretch Stimulation: Its Effects on Alveolar Type II Cell Function in the Lung. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* **2001**, *129*, 245–260.
- (3) Bhowmick, R.; Gappa-Fahlenkamp, H. Cells and Culture Systems Used to Model the Small Airway Epithelium. *Lung* **2016**, *194* (3), 419–428. <https://doi.org/10.1007/s00408-016-9875-2>.
- (4) Bhattacharya, J.; Matthay, M. A. Regulation and Repair of the Alveolar-Capillary Barrier in Acute Lung Injury. *Annu Rev Physiol* **2013**, *75*, 593–615. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183756>.
- (5) Cerveri, I.; Rossi, A. *Manuale Di Fisiopatologia Respiratoria*; Pacini Editore, 2014.
- (6) Nova, Z.; Skovierova, H.; Calkovska, A. Alveolar-Capillary Membrane-Related Pulmonary Cells as a Target in Endotoxin-Induced Acute Lung Injury. *Int J Mol Sci* **2019**, *20* (4). <https://doi.org/10.3390/ijms20040831>.
- (7) Wagner, P. D. The Physiological Basis of Pulmonary Gas Exchange: Implications for Clinical Interpretation of Arterial Blood Gases. *European Respiratory Journal* **2015**, *45* (1), 227–243. <https://doi.org/10.1183/09031936.00039214>.
- (8) Doryab, A.; Tas, S.; Taskin, M. B.; Yang, L.; Hilgendorff, A.; Groll, J.; Wagner, D. E.; Schmid, O. Evolution of Bioengineered Lung Models: Recent Advances and Challenges in Tissue Mimicry for Studying the Role of Mechanical Forces in Cell Biology. *Adv Funct Mater* **2019**, *29* (39). <https://doi.org/10.1002/adfm.201903114>.
- (9) Thompson, C. L.; Fu, S.; Knight, M. M.; Thorpe, S. D. Mechanical Stimulation: A Crucial Element of Organ-on-Chip Models. *Front Bioeng Biotechnol* **2020**, *8* (602646). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.602646>.
- (10) Guenat, O. T.; Berthiaume, F. Incorporating Mechanical Strain in Organs-on-a-Chip: Lung and Skin. *Biomicrofluidics* **2018**, *12* (4). <https://doi.org/10.1063/1.5024895>.

- (11) Wisnivesky, J.; De-Torres, J. P. The Global Burden of Pulmonary Diseases: Most Prevalent Problems and Opportunities for Improvement. *Ann Glob Health* **2019**, *85* (1). <https://doi.org/10.5334/aogh.2411>.
- (12) Terzano, C. *Malattie Dell'apparato Respiratorio*; Springer, 2006.
- (13) <https://www.lung.org/lung-health-diseases/lung-disease-lookup/cystic-fibrosis>.
- (14) <https://www.webmd.com/lung/the-facts-about-pulmonary-edema>.
- (15) Kornecki, A.; Singh, R. N. Acute Respiratory Distress Syndrome. In *Kendig's Disorders of the Respiratory Tract in Children*; Wilmott, R. W., Deterding, R., Li, A., Ratjen, F., Sly, P., Zar, H. J., Bush, A., Eds.; Elsevier, 2019; pp 606–614.
- (16) Nichols, J. E.; Niles, J. A.; Vega, S. P.; Argueta, L. B.; Eastaway, A.; Cortiella, J. Modeling the Lung: Design and Development of Tissue Engineered Macro- and Micro-Physiologic Lung Models for Research Use. *Exp Biol Med* **2014**, *239* (9), 1135–1169. <https://doi.org/10.1177/1535370214536679>.
- (17) Matute-Bello, G.; Frevert, C. W.; Martin, T. R. Animal Models of Acute Lung Injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **2008**, *295*, 379–399. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00010.2008.-Acute>.
- (18) Mowery, N. T.; Terzian, W. T. H.; Nelson, A. C. Acute Lung Injury. *Curr Probl Surg* **2020**, *57* (5). <https://doi.org/10.1016/j.cpsurg.2020.100777>.
- (19) Artzy-Schnirman, A.; Arber Raviv, S.; Doppelt Flikshtain, O.; Shklover, J.; Korin, N.; Gross, A.; Mizrahi, B.; Schroeder, A.; Sznitman, J. Advanced Human-Relevant in Vitro Pulmonary Platforms for Respiratory Therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev* **2021**, *176*. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.113901>.
- (20) Nossa, R.; Costa, J.; Cacopardo, L.; Ahluwalia, A. Breathing in Vitro: Designs and Applications of Engineered Lung Models. *J Tissue Eng* **2021**, *12*. <https://doi.org/10.1177/20417314211008696>.
- (21) Hittinger, M.; Juntke, J.; Kletting, S.; Schneider-Daum, N.; de Souza Carvalho, C.; Lehr, C. M. Preclinical Safety and Efficacy Models for Pulmonary Drug Delivery of Antimicrobials with Focus on in Vitro Models. *Adv Drug Deliv Rev* **2015**, *85*, 44–56. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.10.011>.

- (22) Robinson, N. B.; Krieger, K.; Khan, F.; Huffman, W.; Chang, M.; Naik, A.; Yongle, R.; Hameed, I.; Krieger, K.; Girardi, L. N.; Gaudino, M. The Current State of Animal Models in Research: A Review. *International Journal of Surgery* **2019**, *72*, 9–13. <https://doi.org/10.1016/j.ijssu.2019.10.015>.
- (23) Russell, W. M. S.; Burch, R. L. *The Principles of Humane Experimental Technique*; Methuen & Co. Limited, 1959.
- (24) <https://www.sigmaaldrich.com/IT/it/technical-documents/technical-article/cell-culture-and-cell-culture-analysis/primary-cell-culture/primary-cell-culture>.
- (25) Mora, C.; Serzanti, M.; Consiglio, A.; Memo, M.; Dell’Era, P. Clinical Potentials of Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Biol Toxicol* **2017**, *33* (4), 351–360. <https://doi.org/10.1007/s10565-017-9384-y>.
- (26) Ghaedi, M.; Calle, E. A.; Mendez, J. J.; Gard, A. L.; Balestrini, J.; Booth, A.; Bove, P. F.; Gui, L.; White, E. S.; Niklason, L. E. Human IPS Cell-Derived Alveolar Epithelium Repopulates Lung Extracellular Matrix. *Journal of Clinical Investigation* **2013**, *123* (11), 4950–4962. <https://doi.org/10.1172/JCI68793>.
- (27) Blank, F.; Wehrli, M.; Lehmann, A.; Baum, O.; Gehr, P.; von Garnier, C.; Rothen-Rutishauser, B. M. Macrophages and Dendritic Cells Express Tight Junction Proteins and Exchange Particles in an in Vitro Model of the Human Airway Wall. *Immunobiology* **2011**, *216* (1–2), 86–95.
- (28) Duval, K.; Grover, H.; Han, L. H.; Mou, Y.; Pegoraro, A. F.; Fredberg, J.; Chen, Z. Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology* **2017**, *32* (4), 266–277. <https://doi.org/10.1152/physiol.00036.2016>.
- (29) Habanjar, O.; Diab-Assaf, M.; Caldefie-Chezet, F.; Delort, L. 3D Cell Culture Systems: Tumor Application, Advantages, and Disadvantages. *Int J Mol Sci* **2021**, *22* (22). <https://doi.org/10.3390/ijms222212200>.
- (30) Sundarakrishnan, A.; Chen, Y.; Black, L. D.; Aldridge, B. B.; Kaplan, D. L. Engineered Cell and Tissue Models of Pulmonary Fibrosis. *Adv Drug Deliv Rev* **2018**, *129*, 78–94. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.12.013>.
- (31) Carterson, A. J.; Höner Zu Bentrup, K.; Ott, C. M.; Clarke, M. S.; Pierson, D. L.; Vanderburg, C. R.; Buchanan, K. L.; Nickerson, C. A.; Schurr, M. J. A549 Lung

- Epithelial Cells Grown as Three-Dimensional Aggregates: Alternative Tissue Culture Model for *Pseudomonas Aeruginosa* Pathogenesis. *Infect Immun* **2005**, *73* (2), 1129–1140. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.2.1129-1140.2005>.
- (32) Langhans, S. A. Three-Dimensional in Vitro Cell Culture Models in Drug Discovery and Drug Repositioning. *Front Pharmacol* **2018**, *9* (JAN). <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00006>.
- (33) Transwell® Permeable Supports. Instructions for Use. *Corning Incorporated*. 2007.
- (34) <https://cordis.europa.eu/article/id/188583-the-molecular-basis-of-cell-polarity/it>.
- (35) Pasman, T.; Baptista, D.; van Riet, S.; Truckenmüller, R. K.; Hiemstra, P. S.; Rottier, R. J.; Hamelmann, N. M.; Paulusse, J. M. J.; Stamatialis, D.; Poot, A. A. Development of an in Vitro Airway Epithelial–Endothelial Cell Culture Model on a Flexible Porous Poly(Trimethylene Carbonate) Membrane Based on Calu-3 Airway Epithelial Cells and Lung Microvascular Endothelial Cells. *Membranes (Basel)* **2021**, *11* (3). <https://doi.org/10.3390/membranes11030197>.
- (36) Varone, A.; Nguyen, J. K.; Leng, L.; Barrile, R.; Sliz, J.; Lucchesi, C.; Wen, N.; Gravanis, A.; Hamilton, G. A.; Karalis, K.; Hinojosa, C. D. A Novel Organ-Chip System Emulates Three-Dimensional Architecture of the Human Epithelia and the Mechanical Forces Acting on It. *Biomaterials* **2021**, *275*. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2021.120957>.
- (37) <https://it.moleculardevices.com/applications/3d-cell-models/spheroids>.
- (38) Li, Z. In Vitro Micro-Tissue and -Organ Models for Toxicity Testing. In *Comprehensive Biotechnology*; Moo-Young, M., Ed.; Elsevier, 2011; Vol. 5, pp 551–563.
- (39) Attanasio, C.; Netti, P. A. Bioreactors for Cell Culture Systems and Organ Bioengineering. In *Kidney Transplantation, Bioengineering, and Regeneration: Kidney Transplantation in the Regenerative Medicine Era*; Elsevier Inc., 2017; pp 889–899. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801734-0.00064-3>.
- (40) Doryab, A.; Taskin, M. B.; Stahlhut, P.; Schröppel, A.; Wagner, D. E.; Groll, J.; Schmid, O. A Biomimetic, Copolymeric Membrane for Cell-Stretch Experiments

- with Pulmonary Epithelial Cells at the Air-Liquid Interface. *Adv Funct Mater* **2021**, *31* (10). <https://doi.org/10.1002/adfm.202004707>.
- (41) Eltom, A.; Zhong, G.; Muhammad, A. Scaffold Techniques and Designs in Tissue Engineering Functions and Purposes: A Review. *Advances in Materials Science and Engineering* **2019**, *2019*. <https://doi.org/10.1155/2019/3429527>.
- (42) Garg, K.; Bowlin, G. L. Electrospinning Jets and Nanofibrous Structures. *Biomicrofluidics* **2011**, *5* (1). <https://doi.org/10.1063/1.3567097>.
- (43) Li, D.; Xia, Y. Electrospinning of Nanofibers: Reinventing the Wheel? *Advanced Materials* **2004**, *16* (14), 1151–1170. <https://doi.org/10.1002/adma.200400719>.
- (44) Long, Y.-Z.; Yan, X.; Wang, X.-X.; Zhang, J.; Yu, M. Electrospinning: The Setup and Procedure. In *Electrospinning: Nanofabrication and Applications*; Ding, B., Wang, X., Yu, J., Eds.; William Andrew Publishing, 2019; pp 21–52.
- (45) Martin, I.; Wendt, D.; Heberer, M. The Role of Bioreactors in Tissue Engineering. *Trends Biotechnol* **2004**, *22* (2), 80–86. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2003.12.001>.
- (46) Mahfouzi, S. H.; Amoabediny, G.; Safiabadi Tali, S. H. Advances in Bioreactors for Lung Bioengineering: From Scalable Cell Culture to Tissue Growth Monitoring. *Biotechnol Bioeng* **2021**, *118* (6), 2142–2167. <https://doi.org/10.1002/bit.27728>.
- (47) Pörtner, R.; Nagel-Heyer, S.; Goepfert, C.; Adamietz, P.; Meenen, N. M. Bioreactor Design for Tissue Engineering. *J Biosci Bioeng* **2005**, *100* (3), 235–245. <https://doi.org/10.1263/jbb.100.235>.
- (48) Xie, Y.; Qian, Y.; Wang, Y.; Liu, K.; Li, X. Mechanical Stretch and LPS Affect the Proliferation, Extracellular Matrix Remodeling and Viscoelasticity of Lung Fibroblasts. *Exp Ther Med* **2020**, *20* (5), 1–1. <https://doi.org/10.3892/etm.2020.9133>.
- (49) Cei, D.; Doryab, A.; Lenz, A. G.; Schröppel, A.; Mayer, P.; Burgstaller, G.; Nossa, R.; Ahluwalia, A.; Schmid, O. Development of a Dynamic in Vitro Stretch Model of the Alveolar Interface with Aerosol Delivery. *Biotechnol Bioeng* **2021**, *118* (2), 690–702. <https://doi.org/10.1002/bit.27600>.

- (50) Doryab, A.; Taskin, M. B.; Stahlhut, P.; Schröppel, A.; Orak, S.; Voss, C.; Ahluwalia, A.; Rehberg, M.; Hilgendorff, A.; Stöger, T.; Groll, J.; Schmid, O. A Bioinspired in Vitro Lung Model to Study Particokinetics of Nano-/Microparticles Under Cyclic Stretch and Air-Liquid Interface Conditions. *Front Bioeng Biotechnol* **2021**, *9*. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.616830>.
- (51) Doryab, A.; Taskin, M. B.; Stahlhut, P.; Groll, J.; Schmid, O. Real-Time Measurement of Cell Mechanics as a Clinically Relevant Readout of an In Vitro Lung Fibrosis Model Established on a Bioinspired Basement Membrane. *Advanced Materials* **2022**, *34* (41). <https://doi.org/10.1002/adma.202205083>.
- (52) Giusti, S.; Sbrana, T.; La Marca, M.; Di Patria, V.; Martinucci, V.; Tirella, A.; Domenici, C.; Ahluwalia, A. A Novel Dual-Flow Bioreactor Simulates Increased Fluorescein Permeability in Epithelial Tissue Barriers. *Biotechnol J* **2014**, *9* (9), 1175–1184. <https://doi.org/10.1002/biot.201400004>.
- (53) Box, H.; Livermore, J.; Johnson, A.; McEntee, L.; Felton, T. W.; Whalley, S.; Goodwin, J.; Hope, W. W. Pharmacodynamics of Isavuconazole in a Dynamic In Vitro Model of Invasive Pulmonary Aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* **2016**, *60* (1), 278–287. <https://doi.org/10.1128/AAC.01364-15>.
- (54) Santbergen, M. J. C.; van der Zande, M.; Gerssen, A.; Bouwmeester, H.; Nielen, M. W. F. Dynamic in Vitro Intestinal Barrier Model Coupled to Chip-Based Liquid Chromatography Mass Spectrometry for Oral Bioavailability Studies. *Anal Bioanal Chem* **2020**, *412* (5), 1111–1122. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-02336-6>.
- (55) Francis, I.; Shrestha, J.; Paudel, K. R.; Hansbro, P. M.; Warkiani, M. E.; Saha, S. C. Recent Advances in Lung-on-a-Chip Models. *Drug Discov Today* **2022**, *27* (9), 2593–2602. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2022.06.004>.
- (56) Konar, D.; Devarasetty, M.; Yildiz, D. v.; Atala, A.; Murphy, S. v. Lung-On-A-Chip Technologies for Disease Modeling and Drug Development. *Biomed Eng Comput Biol* **2016**, *7s1*, BECB.S34252. <https://doi.org/10.4137/becb.s34252>.
- (57) Huh, D.; Matthews, B. D.; Mammoto, A.; Montoya-Zavala, M.; Yuan Hsin, H.; Ingber, D. E. Reconstituting Organ-Level Lung Functions on a Chip. *Science (1979)* **2010**, *328* (5986), 1662–1668. <https://doi.org/10.1126/science.1188302>.

- (58) Huh, D. A Human Breathing Lung-on-a-Chip. *Ann Am Thorac Soc* **2015**, *12*, S42–S44. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201410-442MG>.
- (59) Hassell, B. A.; Goyal, G.; Lee, E.; Sontheimer-Phelps, A.; Levy, O.; Chen, C. S.; Ingber, D. E. Human Organ Chip Models Recapitulate Orthotopic Lung Cancer Growth, Therapeutic Responses, and Tumor Dormancy In Vitro. *Cell Rep* **2017**, *21* (2), 508–516. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.09.043>.
- (60) Stucki, A. O.; Stucki, J. D.; Hall, S. R. R.; Felder, M.; Mermoud, Y.; Schmid, R. A.; Geiser, T.; Guenat, O. T. A Lung-on-a-Chip Array with an Integrated Bio-Inspired Respiration Mechanism. *Lab Chip* **2015**, *15* (5), 1302–1310. <https://doi.org/10.1039/c4lc01252f>.
- (61) Felder, M.; Trueeb, B.; Stucki, A. O.; Borcard, S.; Stucki, J. D.; Schnyder, B.; Geiser, T.; Guenat, O. T. Impaired Wound Healing of Alveolar Lung Epithelial Cells in a Breathing Lung-on-a-Chip. *Front Bioeng Biotechnol* **2019**, *7* (JAN). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00003>.
- (62) Jain, A.; Barrile, R.; van der Meer, A. D.; Mammoto, A.; Mammoto, T.; de Ceunynck, K.; Aisiku, O.; Otieno, M. A.; Louden, C. S.; Hamilton, G. A.; Flaumenhaft, R.; Ingber, D. E. Primary Human Lung Alveolus-on-a-Chip Model of Intravascular Thrombosis for Assessment of Therapeutics. *Clin Pharmacol Ther* **2018**, *103* (2), 332–340. <https://doi.org/10.1002/cpt.742>.
- (63) <https://www.ivtech.it/Products/LiveBox2-%28LB2%29/>.
- (64) <https://www.ivtech.it/Products/LiveFlow-%28LF%29/>.
- (65) <https://www.ivtech.it/>.
- (66) Rieckmann, T.; Volker, S. Poly(Ethylene Terephthalate) Polymerization – Mechanism, Catalysis, Kinetics, Mass Transfer and Reactor Design. In *Modern Polyesters: Chemistry and Technology of Polyesters and Copolyesters*; Scheirs, J., Long, T. E., Eds.; John Wiley & Sons, Ltd, 2003; pp 31–115.
- (67) <https://omnexus.specialchem.com/selection-guide/polyethylene-terephthalate-pet-plastic>.
- (68) Çaykara, T.; Sande, M. G.; Azoia, N.; Rodrigues, L. R.; Silva, C. J. Exploring the Potential of Polyethylene Terephthalate in the Design of Antibacterial Surfaces. *Med*

- Microbiol Immunol* **2020**, *209* (3), 363–372. <https://doi.org/10.1007/s00430-020-00660-8>.
- (69) Chen, W.; Mccarthy, T. J. Chemical Surface Modification of Poly(Ethylene Terephthalate). *Macromolecules* **1998**, *31* (11), 3648–3655.
- (70) McKeen, L. The Effect of Heat Aging on the Properties of Sustainable Polymers. In *The Effect of Long Term Thermal Exposure on Plastics and Elastomers*; William Andrew, 2021; pp 313–332.
- (71) Nair, N. R.; Sekhar, V. C.; Nampoothiri, K. M.; Pandey, A. Biodegradation of Biopolymers. In *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Production, Isolation and Purification of Industrial Products*; Pandey, A., Negi, S., Soccol, C. R., Eds.; Elsevier, 2017; pp 739–755.
- (72) Labet, M.; Thielemans, W. Synthesis of Polycaprolactone: A Review. *Chem Soc Rev* **2009**, *38* (12), 3484–3504. <https://doi.org/10.1039/b820162p>.
- (73) Siddiqui, N.; Asawa, S.; Birru, B.; Baadhe, R.; Rao, S. PCL-Based Composite Scaffold Matrices for Tissue Engineering Applications. *Mol Biotechnol* **2018**, *60* (7), 506–532. <https://doi.org/10.1007/s12033-018-0084-5>.
- (74) Backes, E. H.; Harb, S. V.; Beatrice, C. A. G.; Shimomura, K. M. B.; Passador, F. R.; Costa, L. C.; Pessan, L. A. Polycaprolactone Usage in Additive Manufacturing Strategies for Tissue Engineering Applications: A Review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **2022**, *110* (6), 1479–1503. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34997>.
- (75) Schmitt, P. R.; Dwyer, K. D.; Coulombe, K. L. K. Current Applications of Polycaprolactone as a Scaffold Material for Heart Regeneration. *ACS Appl Bio Mater* **2022**, *5* (6), 2461–2480. <https://doi.org/10.1021/acsabm.2c00174>.
- (76) Abedalwafa, M.; Wang, F.; Wang, L.; Li, C. Biodegradable Poly-Epsilon-Caprolactone (PCL) for Tissue Engineering Applications: A Review. *Adv. Mater. Sci* **2013**, *34*, 123–140.
- (77) Tang, C.; Zhou, K.; Zhu, Y.; Zhang, W.; Xie, Y.; Wang, Z.; Zhou, H.; Yang, T.; Zhang, Q.; Xu, B. Collagen and Its Derivatives: From Structure and Properties to Their Applications in Food Industry. *Food Hydrocoll* **2022**, *131*. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.107748>.

- (78) Ahmady, A.; Abu Samah, N. H. A Review: Gelatine as a Bioadhesive Material for Medical and Pharmaceutical Applications. *Int J Pharm* **2021**, *608*. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.121037>.
- (79) Campiglio, C. E.; Negrini, N. C.; Farè, S.; Draghi, L. Cross-Linking Strategies for Electrospun Gelatin Scaffolds. *Materials* **2019**, *12* (15). <https://doi.org/10.3390/ma12152476>.
- (80) Panwar, A.; Sk, M. M.; Lee, B. H.; Tan, L. P. Synthesis and Fabrication of Gelatin-Based Elastomeric Hydrogels through Cosolvent-Induced Polymer Restructuring. *RSC Adv* **2022**, *12* (13), 7922–7934. <https://doi.org/10.1039/d1ra09084d>.
- (81) Tonda-Turo, C.; Cipriani, E.; Gnani, S.; Chiono, V.; Mattu, C.; Gentile, P.; Perroteau, I.; Zanetti, M.; Ciardelli, G. Crosslinked Gelatin Nanofibres: Preparation, Characterisation and in Vitro Studies Using Glial-like Cells. *Materials Science and Engineering C* **2013**, *33* (5), 2723–2735. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.02.039>.
- (82) Tonda-Turo, C.; Gentile, P.; Saracino, S.; Chiono, V.; Nandagiri, V. K.; Muzio, G.; Canuto, R. A.; Ciardelli, G. Comparative Analysis of Gelatin Scaffolds Crosslinked by Genipin and Silane Coupling Agent. *Int J Biol Macromol* **2011**, *49* (4), 700–706. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.07.002>.
- (83) Benella, M. Realizzazione Di Un Modello Di Barriera Alveolo-Capillare Che Simula Il Movimento Respiratorio Tramite l'implementazione Di Un Sistema Di Attuazione Meccanica, Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica, Politecnico di Torino, 2022.
- (84) Shikata, Y.; Rios, A.; Kawkitinarong, K.; DePaola, N.; Garcia, J. G. N.; Birukov, K. G. Differential Effects of Shear Stress and Cyclic Stretch on Focal Adhesion Remodeling, Site-Specific FAK Phosphorylation, and Small GTPases in Human Lung Endothelial Cells. *Exp Cell Res* **2005**, *304* (1), 40–49. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2004.11.001>.
- (85) Chien, S. Mechanotransduction and Endothelial Cell Homeostasis: The Wisdom of the Cell. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **2007**, *292* (10), 1209–1224. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01047.2006.-Vascular>.

- (86) H-C Wang, J.; Goldschmidt-Clermont, P.; Wille, J.; C-P Yin, F. Specificity of Endothelial Cell Reorientation in Response to Cyclic Mechanical Stretching. *J Biomech* **2001**, *34*, 1563–1572.
- (87) Jufri, N. F.; Mohamedali, A.; Avolio, A.; Baker, M. S. Mechanical Stretch: Physiological and Pathological Implications for Human Vascular Endothelial Cells. *Vasc Cell* **2015**, *7* (1). <https://doi.org/10.1186/s13221-015-0033-z>.
- (88) Man, K.; Liu, J.; Phan, K. M.; Wang, K.; Lee, J. Y.; Sun, X.; Story, M.; Saha, D.; Liao, J.; Sadat, H.; Yang, Y. Dimensionality-Dependent Mechanical Stretch Regulation of Cell Behavior. *ACS Appl Mater Interfaces* **2022**, *14* (15), 17081–17092. <https://doi.org/10.1021/acsami.2c01266>.
- (89) Sharifpanah, F.; Behr, S.; Wartenberg, M.; Sauer, H. Mechanical Strain Stimulates Vasculogenesis and Expression of Angiogenesis Guidance Molecules of Embryonic Stem Cells through Elevation of Intracellular Calcium, Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide Generation. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* **2016**, *1863* (12), 3096–3105. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.10.001>.
- (90) Hart, K. C.; Tan, J.; Siemers, K. A.; Sim, J. Y.; Pruitt, B. L.; Nelson, W. J.; Gloerich, M. E-Cadherin and LGN Align Epithelial Cell Divisions with Tissue Tension Independently of Cell Shape. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2017**, *114* (29), E5845–E5853. <https://doi.org/10.1073/pnas.1701703114>.
- (91) Yap, A. S.; Duszyc, K.; Viasnoff, V. Mechanosensing and Mechanotransduction at Cell –Cell Junctions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2018**, *10* (8). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028761>.
- (92) He, J.; Shan, S.; Li, Q.; Fang, B.; Xie, Y. Mechanical Stretch Triggers Epithelial-Mesenchymal Transition in Keratinocytes Through Piezo1 Channel. *Front Physiol* **2022**, *13*. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.745572>.
- (93) Nossa, R.; Costa, J.; Cacopardo, L.; Ahluwalia, A. Engineering a Dynamic Model of the Alveolar Interface for the Study of Aerosol Deposition. *Biomedical Science and Engineering* **2020**, *3* (s3). <https://doi.org/10.4081/bse.2019.115>.

## RINGRAZIAMENTI

Vorrei ringraziare innanzi tutto la mia famiglia, che come sempre, seppure a distanza, mi ha fatto sentire la sua vicinanza e il suo sostegno, permettendomi di crescere e dandomi gli stimoli giusti per affrontare le mie sfide.

Grazie al Politecnico di Torino, per avermi dato la possibilità di approfondire le mie conoscenze e coltivare le mie passioni in questo corso di Laurea Magistrale, in particolar modo durante il percorso di tesi.

Un ringraziamento in particolare a Michela e Cecilia, che mi hanno seguito e insegnato tanto durante le attività svolte in laboratorio, sempre con grande disponibilità e chiarezza. Grazie anche a Daniele e Matteo di IVTech, per tutti i preziosi consigli che mi hanno aiutato a capire meglio diversi aspetti sul sistema utilizzato in questo lavoro. Il vostro contributo è stato fondamentale!

Grazie a tutti i miei amici, quelli più distanti che ho potuto rivedere solo nelle mie brevi permanenze in Sardegna, ma che mi fanno sempre sentire il loro appoggio, e quelli che hanno condiviso con me l'esperienza a Torino, in particolare Luca, Riccardo, Stefano e Valentina, con i quali ho passato tanti bei momenti e trascorso gran parte delle mie giornate negli ultimi due anni.

Infine, un ringraziamento speciale alla città di Torino, per avermi piacevolmente accolto e offerto un ambiente a misura di studente, facendomi sentire come a casa in questa mia prima esperienza fuori sede. Perché si sa, l'ambiente che ci circonda gioca un ruolo di primaria importanza nel determinare il benessere di una persona e l'atteggiamento con cui affrontare gli impegni quotidiani.

Essendo giunto al termine di un percorso così ampio, rappresentato dalla mia intera carriera da studente, mi sono ritrovato a riflettere su tutto quello che la vita mi ha insegnato in questi lunghi anni, a partire dal primo giorno di scuola. Sono convinto che il modo in cui si raggiunge un traguardo del genere sia frutto di un lavoro e di una crescita che vanno al di là di quanto fatto concretamente negli ultimi anni. Ritengo quindi doveroso fare un

ringraziamento generale a tutte le persone che in qualche modo mi hanno accompagnato in questo percorso, contribuendo alla mia crescita personale e professionale. E naturalmente un ringraziamento anche a me stesso, che ho sempre dato tutto e approcciato ogni sfida con passione, impegno e voglia di raggiungere i miei obiettivi, come del resto continuerò a fare nei percorsi che intraprenderò da ora in avanti.