

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA
CAMPUS DI CESENA
SCUOLA DI INGEGNERIA E ARCHITETTURA

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN INGEGNERIA BIOMEDICA

**STUDIO IN SILICO DELL'EFFETTO DELLA
COMPRESSIONE SU UNO SCAFFOLD DI ALGINATO
CON A BORDO CELLULE STAMINALI DA INDURRE
VERSO IL FENOTIPO OSSEO**

Tesi in

FONDAMENTI DI INGEGNERIA DEI TESSUTI BIOLOGICI LM

Relatore

Prof. Emanuele D. Giordano

Presentata da

Arianna Argentati

Correlatore

Dott. Marilisa Cortesi

Anno Accademico 2017/2018

*Alla mia sorellina,
ai miei genitori,
alle mie nonne.*

SOMMARIO

ABSTRACT	4
1. INTRODUZIONE	5
1.1 Ingegneria dei tessuti	5
1.2 Colture cellulari	6
1.3 Scaffold.....	12
1.4 Bioreattore	23
1.5 Metodi Computazionali	27
1.6 SALSA.....	30
1.7 Modello Biologico	32
1.7.1 Scaffold di alginato.....	32
1.7.2 Cellule Staminali	33
1.7.3 Stimolazione meccanica per la formazione di tessuto osseo.....	35
1.8 Scopo	37
2. MATERIALI E METODI	39
2.1 Teoria dell'elasticità	39
2.2 Implementazione in SALSA	41
2.3 File di configurazione	43
2.3.1 Cell types	43
2.3.2 Rules	44
2.3.2.1 Introduzione della compressione meccanica nelle regole	46
2.3.3 Scaffold.....	49
2.3.3.1 Modulo di Young scaffold di alginato	49
2.3.4 Stress.....	49
2.3.4.1 Densità scaffold di alginato.....	50
2.3.4.2 Coefficiente di Poisson scaffold di alginato.....	50
2.4 Protocolli di stimolazione	51

2.5	File di output Stress	53
3.	RISULTATI E DISCUSSIONE	55
3.1	Analisi delle 10 condizioni	55
3.1.1	Condizione 1	55
3.1.2	Condizione 2	57
3.1.3	Confronto condizioni 3, 4, 5, 6, 7, 8	58
3.1.4	Condizioni 9 e 10	59
3.1.5	Condizioni migliori	61
3.2	Analisi comparata condizioni migliori	62
4.	CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI	71
	APPENDICE	73
	BIBLIOGRAFIA	75
	RINGRAZIAMENTI	80

ABSTRACT

L'ingegneria dei tessuti applica principi dell'ingegneria e delle scienze della vita alla realizzazione di costrutti in grado di sostituire o riparare tessuti od organi danneggiati attraverso l'utilizzo di cellule a bordo di scaffold e stimoli solubili o fisici. L'integrazione di questi elementi genera sistemi complessi che possono essere descritti e studiati attraverso modelli computazionali, ovvero modelli matematici che sfruttano la simulazione computerizzata per analizzarne il comportamento.

SALSA (ScAffoLd SimulAtor) è uno strumento computazionale *general purpose* in grado di simulare il comportamento di una popolazione di cellule coltivate a bordo di uno scaffold 3D. Il presente lavoro di tesi si propone di estendere SALSA, integrandovi l'analisi dell'effetto di uno stimolo meccanico virtuale degli scaffold. In particolare, è stata simulata la compressione ciclica di scaffold di alginato con a bordo cellule staminali, utilizzando 10 diversi protocolli di stimolazione. L'analisi comparata dei risultati di questa analisi ha permesso di individuare la condizione associata ad una migliore induzione del fenotipo osseo, ovvero cicli di stimolazione doppia quotidiana, ad 1 Hz, per almeno il 70% della durata della prova.

Questo studio computazionale ha anche evidenziato un comportamento emergente: la compressione ciclica favorisce il processo proliferativo delle cellule staminali e, in alcuni casi, il mantenimento di questa popolazione nel tempo.

I risultati presentati in questo elaborato sono coerenti con dati sperimentali pubblicati in letteratura.

1. INTRODUZIONE

1.1 Ingegneria dei tessuti

Il termine ingegneria dei tessuti è stato coniato ufficialmente nel 1988 in un workshop della National Science Foundation (USA) e indica “l’applicazione dei principi e dei metodi dell’ingegneria e delle scienze della vita per la comprensione delle relazioni tra struttura e funzione in tessuti normali o patologici al fine di creare costrutti biologici che sostituiscano, riparino, mantengano o migliorino la funzione di un tessuto o di un organo lesa” (1). Gaspare Tagliacozzi, professore di anatomia dell’Università di Bologna, nel suo lavoro del 1597 intitolato “De Custorum Chirurgia per Insitionem” fu il primo ad ideare ed effettuare una sostituzione tissutale: creò un naso a partire dal lembo di un avambraccio.

L’ingegneria dei tessuti si basa su tre componenti principali che ne costituiscono la cosiddetta triade:

1. un supporto (scaffold) necessario per sostenere la crescita e lo sviluppo del tessuto.
2. Una sorgente di cellule che può essere autologa od eterologa;
3. Fattori di crescita e/o stimoli biofisici che favoriscano, all’interno dello scaffold, la crescita cellulare e il differenziamento (2).

Tre sono le principali strategie adottate nel campo dell’ingegneria tissutale per il trattamento di tessuti danneggiati o mancanti:

1. impianto di cellule isolate: si trapianta un’intera popolazione cellulare oppure si isolano singole cellule (dal paziente o dal donatore) e le si espandono *ex vivo* prima dell’impianto. Il trapianto di midollo osseo rappresenta un esempio di questa tecnica (2).
2. Impianto di scaffold e cellule: le cellule, estratte dal paziente o dal donatore, sono seminate in uno scaffold e lasciate crescere e proliferare, eventualmente utilizzando un bioreattore, fino alla formazione di un tessuto maturo che viene poi trapiantato nella parte del corpo che ne è in difetto (figura 1.1).
3. Rigenerazione *in situ*: si cerca di stimolare la formazione di nuovo tessuto direttamente nel sito dove è mancante o danneggiato, a partire dalle cellule native del paziente. Al fine di favorire la migrazione e l’opportuno differenziamento

possono essere somministrati localmente specifici farmaci o proteine coinvolte nei vari processi (2) o si possono utilizzare stimoli esterni od appositi scaffold.

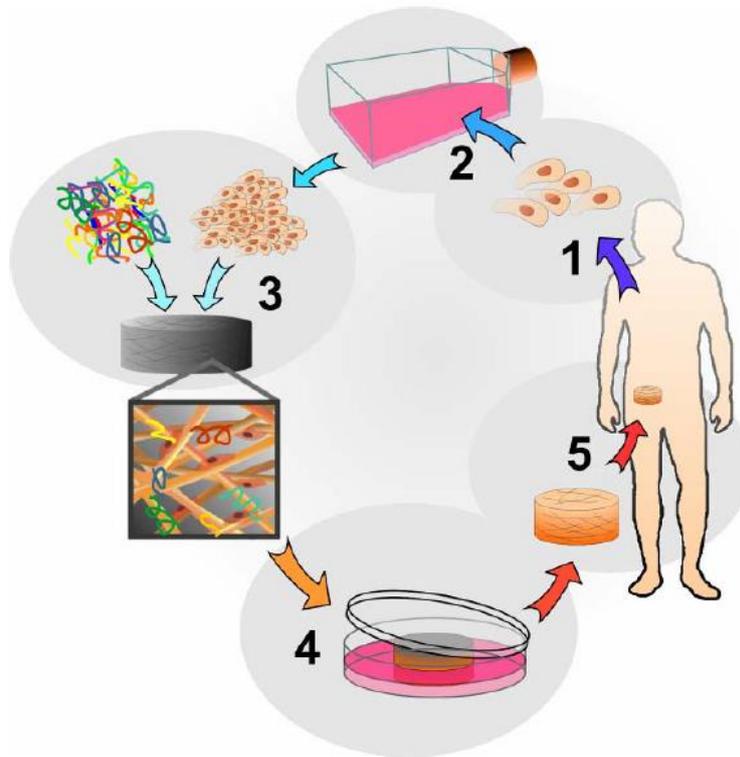


Figura 1.1: Il ciclo dell'ingegneria dei tessuti. 1: una piccola porzione di cellule viene rimossa dal corpo del paziente. 2: le cellule sono seminate in cultura e fatte proliferare. 3: queste cellule sono poi inserite in appositi scaffold insieme a specifici fattori di crescita che ne aumentano la proliferazione. 4: anche questi scaffold sono posti in cultura per favorire la formazione del tessuto. 5: il tessuto rigenerato è impiantato nel sito dove è presente il tessuto danneggiato per integrarsi con il tessuto naturale. Figura riprodotta da (3).

1.2 Colture cellulari

Le colture cellulari sono sistemi che permettono la coltivazione di cellule *in vitro*, in condizioni controllate, attraverso l'apporto di elementi nutritivi di base, contenuti nei terreni di coltura nei quali sono seminate. Attraverso l'ausilio di ambienti artificiali che consentono di regolare temperatura, umidità e concentrazione di gas, le cellule sono in grado di crescere, proliferare, differenziare, migrare e riprodurre in generale i vari meccanismi che sono alla base del loro comportamento *in vivo* (4).

Possiamo distinguere colture cellulari 2D e 3D; si rimanda alla tabella 1.1 per un confronto delle rispettive caratteristiche.

Caratteristiche	Sistema di coltura 2D	Sistema di coltura 3D
1. Pattern di crescita cellule	Planare	Tridimensionale
2. Proliferazione	Medio-alta	Medio-bassa
3. Migrazione	Limitata	Elevata
4. Riproduzione ambiente cellulare	No	Sì
5. Flessibilità per un supporto fisico	No	Sì
6. Gradienti di ossigeno/nutrienti/trattamenti	No	Sì
7. Sintesi matrice extracellulare	Limitata	Elevata
8. Interazioni cellula-matrice	Limitate	Elevate
9. Interazioni cellula-cellula	Planare	Tridimensionale
10. Possibilità di co-coltura	Limitata	Sì
11. Sensitività alle terapie farmacologiche	Elevata	Bassa
12. Risposta alle radiazioni	Elevata	Bassa
13. Modellazione dei tumori <i>in vitro</i>	No	Sì
14. Sfruttabile nell'ingegneria dei tessuti	No	Sì

Tabella 1.1: Comparazione sistemi di coltura 2D e 3D. Le differenze tra i due sistemi possono portare esiti molto diversi per quanto riguarda la migrazione, la proliferazione, la crescita cellulare ecc. La maggiore potenza e versatilità dei sistemi 3D risulta evidente. Tabella riprodotta da (5).

Nelle colture 2D, usate fin dagli inizi del 1900, le cellule sono seminate su substrati di adesione quali piastre di vetro o plastica, sui quali manifestano un pattern di crescita planare (figura 1.2). Nonostante siano ancora ampiamente utilizzate (sono sistemi consolidati, economici, sui quali è presente molta letteratura con cui confrontare i risultati ottenuti) non riproducono correttamente la realtà fisiologica. Le cellule infatti sono

disposte su superfici bidimensionali, ricevono uguali quantità di nutrienti, fattori di crescita e farmaci (in un dato istante temporale la maggior parte di esse si trova nello stesso stadio cellulare), sono più piatte ed allungate rispetto alla loro forma reale. La proliferazione, il differenziamento, l'apoptosi, l'espressione dei geni e delle proteine sono alcuni dei processi che risentono di questa modifica di conformazione (6) . Per queste ragioni, negli ultimi anni, i sistemi di coltura tridimensionali sono stati sempre più oggetto di studi e di utilizzo (figura 1.2). La ricerca ha dimostrato che rappresentano più accuratamente il microambiente nel quale le cellule vivono naturalmente poiché riescono a riprodurre le interazioni cellula-cellula e cellula-matrice extracellulare, consentono la co-coltura di tipi cellulari eterogenei e raccolgono cellule in stadi di vita differenti (proliferante, quiescente, necrotico ecc.).

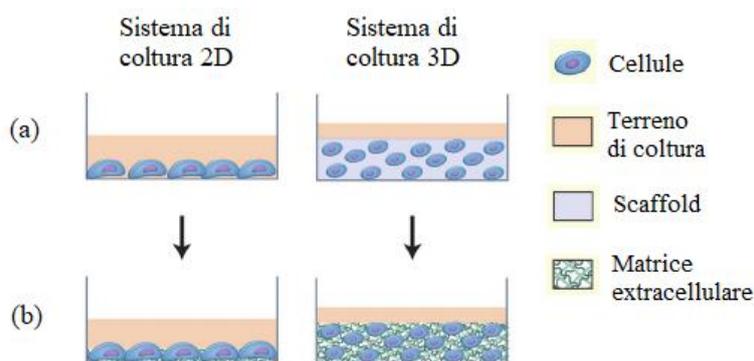


Figura 1.2: Esempio di sistemi coltura 2D e 3D. (a) Le cellule, immerse nel terreno di coltura (rosa), aderiscono al fondo della piastra di Petri e manifestano un pattern di crescita planare, nel sistema 2D. Nel sistema 3D le cellule sono seminate all'interno dello scaffold e si distribuiscono in maniera tridimensionale. (b) Le cellule producono la matrice extracellulare.

I sistemi di coltura 3D vengono generalmente suddivisi in due classi: scaffold-free e scaffold-based a seconda che utilizzino o meno tale supporto. Attualmente esistono molteplici tecniche appartenenti all'una o all'altra categoria; la descrizione che segue si concentra sulle principali.

Tra i metodi scaffold-free, rappresentati in figura 1.3, si distinguono:

- **Hanging drops** (figura 1.3a): le cellule tendono naturalmente ad aggregarsi tra loro in sferoidi tridimensionali in assenza di superfici sulle quali attaccarsi. Le piastre che permettono di attuare tale tecnica, a differenza di quelle tradizionali,

contengono dei pozzetti con delle aperture sul fondo che permettono al terreno di coltura di formare delle gocce di ampiezza sufficiente per favorire l'aggregazione cellulare e, al tempo stesso, generare la tensione superficiale necessaria alle gocce per non distruggersi durante la manipolazione. All'interno di ogni pozzetto, in un arco di tempo variabile (da poche ore fino a diversi giorni) si forma uno sferoide, la cui dimensione è proporzionale al numero di cellule inserite nel media.

- **Low adhesion plates** (figura 1.3b): anche in questa tecnica, come nella precedente, si sfrutta la naturale aggregazione delle cellule utilizzando piastre che presentano, sul fondo dei pozzetti, un rivestimento con un materiale specifico che minimizza l'adesione cellulare. Inoltre, per favorire la formazione di singoli aggregati coerenti e centrati nel pozzetto, il fondo di ciascuno di essi possiede una forma rotonda o conica.
- **Agitation-based approaches** (figura 1.3.c): in questi tipi di approcci, una sospensione di cellule all'interno di un contenitore viene mantenuta in uno stato di moto continuo in modo tale che non aderiscano alle pareti e che aumentino le interazioni cellula-cellula. Possiamo distinguere due categorie di agitation-based approaches a seconda che il moto rotatorio venga impartito a tutto il contenitore (c-ii) o solo alla sospensione di cellule tramite un delicato mescolamento (c-i).

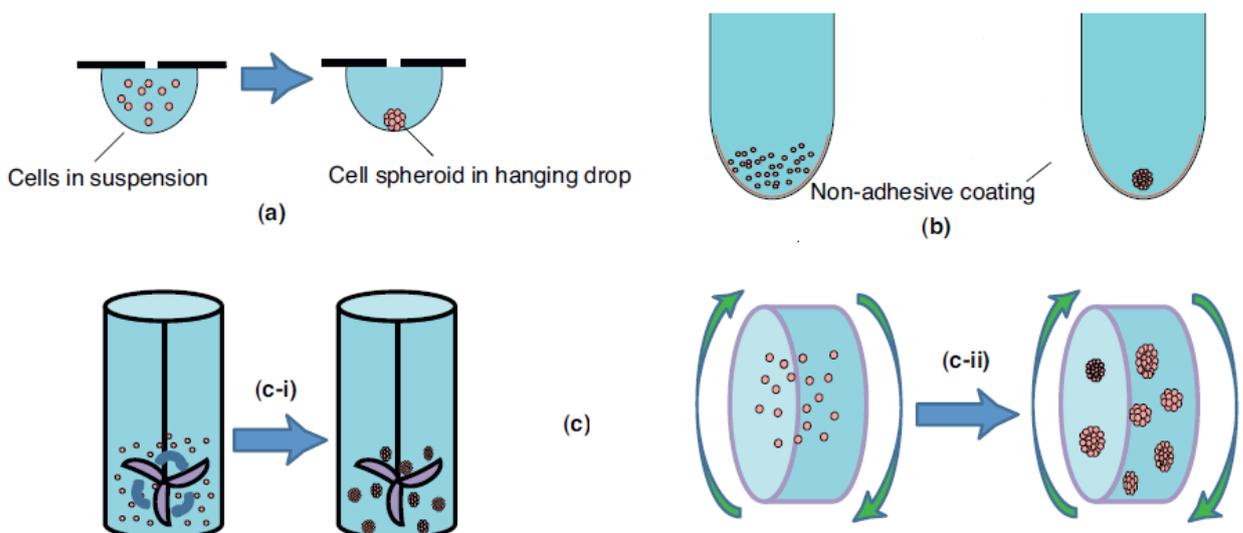


Figura 1.3: Tecniche scaffold-free: (a) hanging drops, (b) low adhesion plates, (c) agitation-based approaches. Figura riportata con modifiche da (7).

Tra i sistemi scaffold-based si distinguono:

- **Scaffold naturali ed artificiali**, descritti nel dettaglio nel paragrafo successivo.
- **Micropatterned surface microplates**: sul fondo di ogni pozzetto sono posizionati scomparti di dimensioni millimetriche, di forma rotonda o quadrata che possono essere tra loro isolati o comunicanti (figura 1.4). Le superfici di questi micropozzetti sono ricoperte da un materiale che limita l'adesione delle cellule alle pareti. Le cellule inserite in queste strutture, nel giro di qualche giorno formano sferoidi o, nel caso di micropozzetti comunicanti, un network di cellule contigue (figura 1.5) (8).

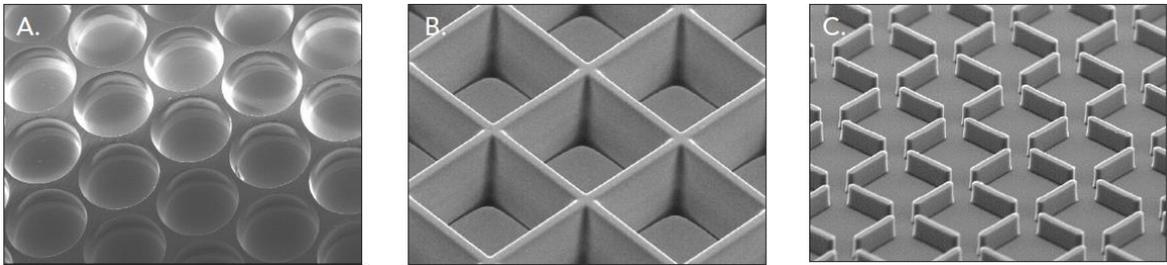


Figura 1.4: Micropatterned surface microplates. Figura riprodotta da (8).

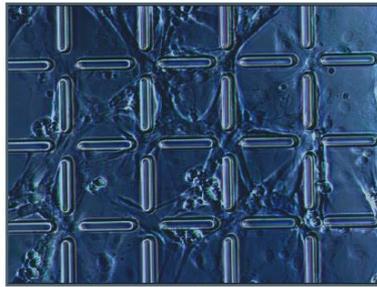


Figura 1.5: Micropatterned surface microplates contenenti cellule che si dispongono a formare un network. Figura riprodotta da (8).

In tabella 1.2 i principali vantaggi e svantaggi delle tecniche sopracitate.

Tecniche di coltura 3D	Vantaggi	Svantaggi
Hanging drops	<ul style="list-style-type: none"> • Economica. • Gli sferoidi sono omogenei. • Adatta nei test ad alta produttività. • Gli sferoidi prodotti sono di facile accesso. 	<ul style="list-style-type: none"> • Più costosa perché necessita di piastre speciali. • Laboriosa. • I piccoli volumi di coltura rendono difficile il cambio di terreno.
Low adhesion plates	<ul style="list-style-type: none"> • Relativamente semplice. • Economica. • Adatta nei test ad alta produttività. • Gli sferoidi prodotti sono di facile accesso. 	<ul style="list-style-type: none"> • Variabilità nella forma e dimensione delle cellule. • Applicare il rivestimento sul fondo dei pozzetti è relativamente laborioso.
Agitation-based approaches	<ul style="list-style-type: none"> • Semplice. • La produzione su larga scala è facilmente realizzabile. • Il movimento della coltura favorisce il trasporto dei nutrienti. • Gli sferoidi prodotti sono di facile accesso. 	<ul style="list-style-type: none"> • Richiede un'attrezzatura specializzata. • Non c'è controllo sul numero e la forma degli sferoidi. • Le cellule sono esposte a forze di taglio che potrebbero essere problematiche per cellule sensibili.
Scaffold naturali ed artificiali	<ul style="list-style-type: none"> • Forniscono un supporto 3D che riproduce abbastanza fedelmente l'ambiente <i>in vivo</i>. • Possono incorporare fattori di crescita. 	<ul style="list-style-type: none"> • Costosa per produzioni su larga scala.

Micropatterned surface microplates	<ul style="list-style-type: none"> • Semplice. • Controllo sulla dimensione degli sferoidi. • Le cellule manifestano un comportamento simile a quello <i>in vivo</i>. 	<ul style="list-style-type: none"> • Richiede strumentazione specifica (microplates) • Pattern fissi. • I supporti sono usa e getta.
------------------------------------	--	---

Tabella 1.2: Vantaggi e svantaggi delle principali tecniche di coltura 3D. Tabella riprodotta con modifiche da (7).

1.3 Scaffold

I tessuti connettivi (tessuto osseo, cartilagineo, adiposo ecc.) sono composti da cellule e matrice extracellulare. Quest'ultima, la cui composizione specifica varia a seconda del tessuto, ne rappresenta la componente principale ed è sintetizzata dalle stesse cellule. È formata da proteine fibrose strutturali, proteoglicani e polisaccaridi che si articolano in una complessa struttura tridimensionale (figura 1.6).

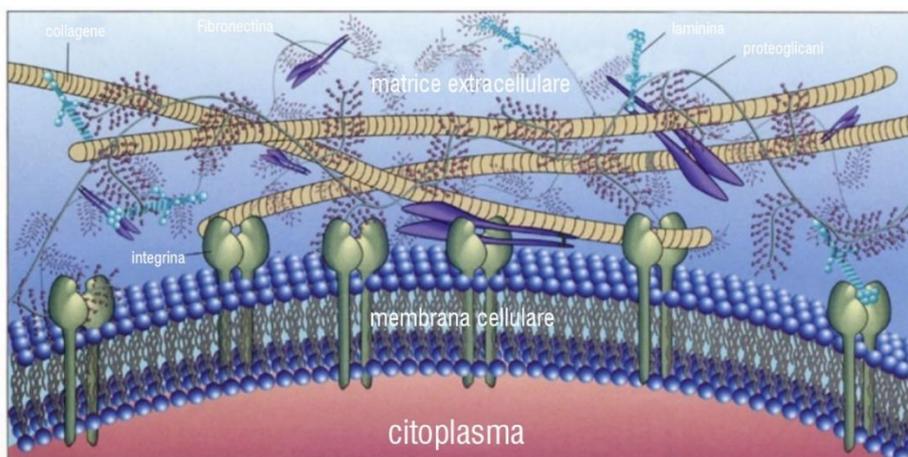


Figura 1.6: Rappresentazione della matrice extracellulare.

Le funzioni svolte dalla matrice sono molteplici:

- fornisce il supporto strutturale e un ambiente favorevole alle cellule che contiene perché forma una rete che permette loro di aderire, di muoversi (9), di crescere e differenziare.

- Contribuisce alle proprietà meccaniche del tessuto conferendogli forma, rigidità e stabilità meccanica.
- Contiene i fattori di crescita e ne potenzia l'azione (10).
- Interagisce con le cellule condizionandone il comportamento (proliferazione, differenziamento ecc.).
- Fornisce un ambiente flessibile e dinamico che risulta particolarmente utile nei processi che richiedono il rimodellamento del tessuto come la guarigione delle ferite (10).

Le interazioni tra cellule e matrice sono complesse e numerose. Le cellule sintetizzano, secernono, modificano e degradano senza sosta le componenti della matrice e, al tempo stesso, come accennato precedentemente, “reagiscono al contatto con essa attraverso una modulazione del metabolismo, della proliferazione e della motilità” (9).

Lo scaffold (figura 1.7) è un supporto poroso, realizzato con materiale biocompatibile, che svolge lo stesso ruolo che ricopre, *in vivo*, la matrice extracellulare. Oltre a conferire sostegno e integrità al sito di utilizzo (è in grado di assorbire i carichi compressivi, di trazione e di taglio), permette alle cellule di sopravvivere, crescere, proliferare, migrare e differenziare; i pori consentono il passaggio di gas, nutrienti e metaboliti.



Figura 1.7: Scaffold di alginato prodotto nel Laboratorio di Ingegneria Cellulare e Molecolare “S. Cavalcanti” della UOS DEI di Cesena

Gli scaffold possono essere utilizzati sia in sistemi di modellazione 3D, *in vitro*, sia in ambito clinico. Nei sistemi di modellazione 3D si sfruttano gli scaffold per poter

approfondire, a livello molecolare, le conoscenze di biologia cellulare, avvalendosi anche dell'ausilio di strumenti ottici o di imaging (11). Dal punto di vista clinico, la medicina rigenerativa e l'ingegneria dei tessuti progettano scaffold impiantabili per mantenere o ripristinare la funzionalità originale di tessuti danneggiati. Affinché possano riprodurre più fedelmente possibile la matrice extracellulare naturale, gli scaffold dovranno possedere i seguenti requisiti:

- **Biocompatibilità:** questo è il primo requisito che ogni scaffold impiantato deve possedere per non causare riposte immunitarie gravi che possono portare ad infiammazioni o addirittura al rigetto da parte del corpo.
- **Biodegradabilità:** gli scaffold non sono sistemi permanenti. L'obiettivo dell'ingegneria tissutale è fare in modo che, nel tempo, il corpo produca la propria matrice extracellulare e sostituisca quella impiantata. Lo scaffold deve quindi essere biodegradabile e il prodotto della sua degradazione non deve essere tossico e deve essere espulso dal corpo senza interferire con gli altri organi (1). Inoltre, il rateo di degradazione dello scaffold deve essere in equilibrio con quello di formazione del nuovo tessuto.
- **Proprietà meccaniche:** lo scaffold deve possedere proprietà meccaniche affini a quelle del sito anatomico in cui viene inserito e deve essere abbastanza forte da resistere alle manipolazioni a cui andrà incontro durante l'impianto, (1) e ai carichi e agli stress fisiologici a cui sarà sottoposto durante il suo funzionamento. Inoltre, affinché la struttura artificiale non si degradi o addirittura si rompa, si deve far in modo che, all'interfaccia tra scaffold ed ambiente circostante, non si formino zone di accumulo di stress.
- **Porosità:** gli scaffold devono possedere una struttura altamente porosa ed interconnessa in modo da favorire la deposizione, la crescita e la migrazione delle cellule, la diffusione dei nutrienti e lo smaltimento dei metaboliti. Il diametro medio dei pori varia a seconda del tipo cellulare e del tessuto che si vuole riprodurre. Vi deve essere, inoltre, un giusto equilibrio tra porosità e proprietà meccaniche. Una rigidità eccessiva, ottenuta con una riduzione della porosità, può comportare la morte cellulare, a causa della riduzione della mobilità di cellule e nutrienti e all'accumulo di metaboliti. Al contrario, una porosità troppo elevata può compromettere l'integrità strutturale dello scaffold.

- **Rapporto area superficiale-volume:** vi deve essere un elevato rapporto tra l'area superficiale ed il volume dello scaffold per poter permettere la semina di un alto numero di cellule.
- **Processabilità e sterilizzazione:** il materiale deve essere facilmente lavorabile e resistere agli inevitabili processi di sterilizzazione.

Tutte le proprietà sopraelencate sono strettamente connesse ad un altro importante criterio: il biomateriale con il quale lo scaffold viene realizzato. Tra le 4 classi di biomateriali esistenti (metalli, ceramici, polimeri e compositi), i materiali polimerici e ceramici sono quelli maggiormente utilizzati. I materiali polimerici possono essere classificati in sintetici o naturali (tabella 1.3).

Polimeri Sintetici	Polimeri Naturali
Acido poliglicolico (PGA), Acido polilattico (PLA), Acido polilattico-co-glicolico (PLGA), Policaprolattone (PCL), Glicole polietilenico (PEG), Acido polivinilico (PVA), Acido acrilico (PAA) ecc.	Alginato, Collagene, Gelatina, Ialunorato, Glicosaminoglicano, Chitosano, Seta, Fibrina, Destrano, Matrigel etc.

Tabella 1.3: Polimeri sintetici e naturali utilizzati nella fabbricazione degli scaffold. Tabella riprodotta da (11).

I polimeri sintetici hanno il vantaggio di poter essere modellati su “misura” in base alle caratteristiche del tessuto. Tuttavia, alcuni di essi, degradandosi, liberano dei prodotti acidi che possono alterare il pH dell'ambiente circostante causando risposte infiammatorie.

I polimeri naturali come il collagene, l'alginato, il chitosano ecc. forniscono un miglior supporto per l'adesione, la crescita cellulare e il differenziamento rispetto a quelli sintetici, sono biocompatibili e non degradano in prodotti tossici. Tuttavia, risulta ancora complicato realizzare scaffold con polimeri naturali che abbiano una struttura omogenea e riproducibile. (1) Inoltre, sono carenti dal punto di vista delle proprietà meccaniche ed hanno un costo relativamente elevato.

I materiali ceramici sono composti inorganici solidi con una struttura cristallina. Sono caratterizzati da superfici dure ma fragili, da una scarsa elasticità, da un lento rateo di degradazione (dell'ordine di mesi o anni) e da elevata rigidità. Quest'ultima qualità, associata alla loro struttura, simile a quella minerale dell'osso, li renderebbe particolarmente indicati nel campo dell'ingegneria ossea tissutale. Nonostante ciò, la fragilità, le difficoltà incontrate nel controllarne la degradazione e nel modellarne la forma, ne hanno limitato l'utilizzo. L'idrossiapatite (HA) ed il tricalcio fosfato (TCP) sono tra i ceramici più usati (2).

Dettagli ulteriori riguardo al materiale considerato in questo studio saranno descritti nel seguito.

Le proprietà dei sistemi naturali (per esempio il tessuto osseo) spesso derivano da una struttura gerarchica o multiscala. Per questo motivo, anche nella realizzazione degli scaffold, si cerca di applicare un approccio di questo tipo (figura 1.8) che spazia dalla macroscale ($10^{-1} - 10^{-3}$ m) alla microscale ($10^{-3} - 10^{-6}$ m) fino alla nanoscale ($10^{-6} - 10^{-9}$ m). Le strutture in macroscale determinano la forma e la dimensione complessiva dello scaffold. Per esempio, nel campo dell'ingegneria tissutale, la forma e la dimensione della matrice deve eguagliare quella del sito anatomico in cui sarà inserita (11). Lunghezze dell'ordine dei micron devono essere utilizzate per poter riprodurre l'architettura tissutale come ad esempio il complesso network che caratterizza la matrice extracellulare. La maggior parte dei componenti individuali della matrice extracellulare è in scala nanometrica; a questo livello di dettaglio inoltre avvengono le interazioni tra cellula e substrato.

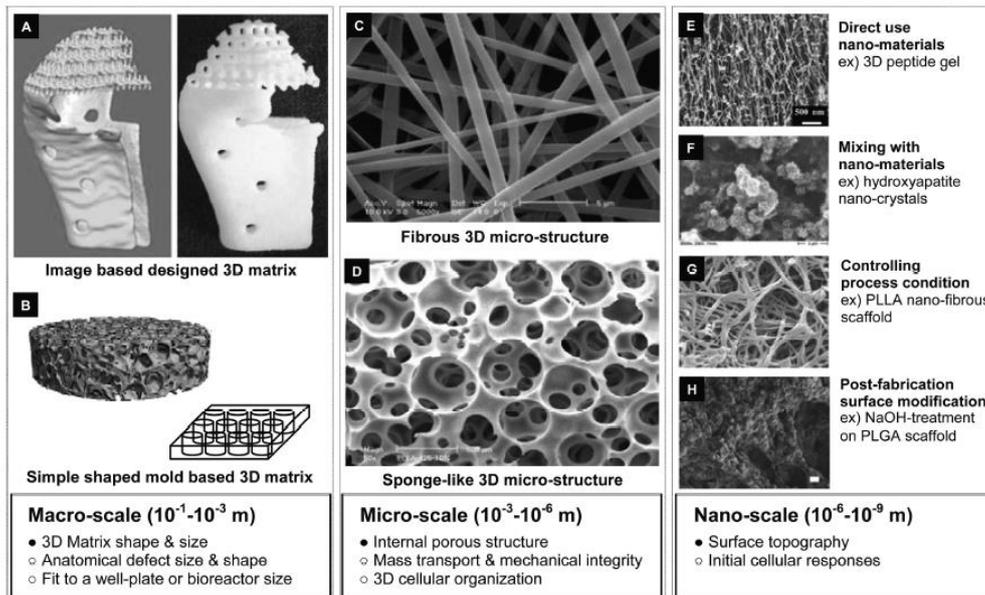


Figura 1.8: Criteri di progettazione multiscala per la realizzazione degli scaffold.
Figura riprodotta da (11).

Le molteplici tecniche di fabbricazione degli scaffold possono essere distinte in tecniche tradizionali e tecniche di prototipazione rapida. Le prime non permettono di controllare la struttura interna dello scaffold o di realizzare architetture complesse; richiedono una buona manualità da parte dell'operatore e necessitano di solventi tossici che, se non completamente rimossi, possono portare alla morte cellulare (12). Inoltre, gli scaffold presentano una rigidità molto inferiore rispetto a quella dei tessuti naturali. Le tecniche di prototipazione rapida producono in tempi veloci oggetti di geometria variabile i cui modelli sono realizzati al computer con un sistema CAD (computer aided design). Permettono quindi di realizzare scaffold con rigidità variabili dai tessuti molli fino ai tessuti duri, con architetture complesse, controllabili e ripetibili grazie all'ausilio di strumenti controllati da computer. Il loro principale limite, sul quale si sta concentrando molto la ricerca, è lo scarso numero di materiali biocompatibili che possono essere utilizzati.

Tra le principali tecniche convenzionali si distinguono:

- **Salt leaching:** l'agente porogeno, costituito dai cristalli di sale, viene depositato in uno stampo e successivamente si aggiunge un polimero per riempire gli spazi rimasti. La rimozione del sale, tramite la dissoluzione in un solvente, permette di ottenere uno scaffold poroso e solido (12).

- **Gas forming:** in questa tecnica si utilizza il gas come agente porogeno. Mediante un processo di stampaggio a compressione, si creano delle strutture a forma di disco a partire dal polimero selezionato per lo scaffolding. Successivamente, all'interno di una camera, i dischi si saturano con CO₂ ad alta pressione per alcuni giorni e si riempiono di bolle di gas. La pressione viene poi ridotta gradualmente fino a raggiungere quella atmosferica. I pori nello scaffold si creano a partire dalle molecole di gas che lasciano il polimero.
- **Thermally induced phase separation (solid-liquid o liquid-liquid):** i sistemi omogenei multicomponenti, sotto certe condizioni, diventano termodinamicamente instabili e si separano in più fasi per abbassare l'energia libera di sistema (13). Il processo di separazione è indotto termicamente: il polimero viene sciolto in un solvente e la soluzione viene abbassata ad una temperatura tale da favorire la divisione di fase. Si formano due fasi, una ad alta concentrazione polimerica che formerà lo scaffold ed una a bassa concentrazione polimerica, ricca di solvente. La rimozione di quest'ultima genera i pori nella matrice e avviene mediante evaporazione (liquid-liquid phase separation) o per sublimazione (solid-liquid phase separation) in base allo stato del solvente (liquido o solido).
- **Self-assembly:** in questa tecnica si sfrutta il naturale processo di autoassemblaggio delle molecole indotto dalla formazione di legami non covalenti o da legami covalenti deboli (14). Senza interventi esterni le molecole si arrangiano in strutture tridimensionali.
- **Freeze dryng:** il polimero sintetico selezionato viene sciolto in un solvente e la soluzione ottenuta viene raffreddata al di sotto del suo punto di congelamento. La soluzione solidificata è posta in una camera a bassa pressione che provoca la sublimazione del solvente. Ciò che resta al termine della procedura è uno scaffold con pori interconnessi.
- **Cell encapsulation:** in questa tecnica le cellule (conservate in sospensione) sono incorporate nello scaffold durante il processo di fabbricazione. Le cellule sono miscelate insieme al materiale selezionato per lo scaffolding e, attraverso particolari procedimenti chimici o fisici, si induce la gelificazione della soluzione.

Le principali tecniche di prototipazione rapida si suddividono in:

- **3D Printing** (figura 1.9A): in questa tecnica si sfrutta la tecnologia delle comuni stampanti a getto di inchiostro; il processo è automatizzato e controllato tramite computer. Il prodotto finale, tridimensionale, è dovuto alla sovrapposizione consecutiva di strati 2D di materiale. Il processo inizia con la distribuzione di uno strato di polvere del materiale scelto per lo scaffold in una piattaforma specifica; successivamente, una testina di stampa a getto d'inchiostro deposita un agente legante che unisce insieme le particelle di polvere (15). La superficie ottenuta viene ricoperta da un nuovo strato di polvere e il procedimento viene ripetuto. Al termine del processo si eliminano le polveri in eccesso.
- **Selective laser sintering** (figura 1.9B): in questa tecnica le polveri del biomateriale sono stratificate su un supporto e fuse, strato dopo strato, da un raggio laser controllato al computer.
- **Stereolithography** (figura 1.9C): In questa tecnica si utilizzano fotopolimeri, materiali in grado di polimerizzare se esposti a radiazioni e raggi laser ultravioletti. Il fotopolimero, sottoforma di resina liquida, viene immesso in una vasca, all'interno della quale è presente una piattaforma mobile. Inizialmente la piattaforma è posta poco al di sotto del livello della resina. Il raggio laser raggiunge la superficie del liquido tramite un sistema di specchi e crea il primo strato. Successivamente la piattaforma viene abbassata, il fotopolimero ricopre la superficie appena polimerizzata e il processo ricomincia.
- **Fused deposition modelling** (figura 1.9D): Il materiale termoplastico scelto viene fuso, estruso da un ugello e depositato su una piattaforma sulla quale indurisce e si fissa (16). La piattaforma viene abbassata ed il processo ricomincia formando, strato dopo strato, il prodotto tridimensionale finale.

La tabella 1.4 elenca i principali vantaggi e svantaggi delle tecniche appena descritte.

	Vantaggi	Svantaggi
TECNICHE CONVENZIONALI		
Salt leaching	<ul style="list-style-type: none"> • La dimensione e il numero dei pori può essere controllato in base all'agente porogeno scelto. • Si utilizzano poche quantità di polimero. 	<ul style="list-style-type: none"> • Non si ha controllo sulle distanze tra i pori e la forma che acquisiscono. • Impiego di solventi potenzialmente nocivi per le cellule.
Gas forming	<ul style="list-style-type: none"> • Non richiede l'impiego di solventi. 	<ul style="list-style-type: none"> • Risulta difficile controllare la dimensione dei pori. • Le interconnessioni tra i pori sono ridotte.
Thermally Induced Phase separation (solid- liquid o liquid-liquid)	<ul style="list-style-type: none"> • Le interconnessioni tra i pori sono elevate. • Variando i parametri del processo (temperatura e velocità di raffreddamento) e il tipo di solvente, si possono controllare forma e dimensione dei pori. 	<ul style="list-style-type: none"> • Impiego di solventi. • Limitata a pochi polimeri.
Self-assembly	<ul style="list-style-type: none"> • Il network di fibre nello scaffold ha dimensioni, dell'ordine dei nanometri, affini a quelle reali. 	<ul style="list-style-type: none"> • Le proprietà meccaniche degli scaffold ottenuti sono limitate. • Bassa produttività. • Procedura complessa.
Freeze dryng	<ul style="list-style-type: none"> • Si evita di utilizzare alte temperature che possono ridurre l'attività di fattori 	<ul style="list-style-type: none"> • Impiego di solventi. • Pori sono irregolari e di piccole dimensioni.

	<p>biologici incorporati nella struttura (15).</p> <ul style="list-style-type: none"> • La dimensione dei pori può essere controllata variando la temperatura di raffreddamento. 	
Cell encapsulation	<ul style="list-style-type: none"> • Le cellule sono altamente incorporate e distribuite omogeneamente nel costruito. 	<ul style="list-style-type: none"> • Il materiale scelto deve essere citocompatibile e questo limita il numero di materiali utilizzabili. • Il controllo della struttura della matrice è limitato a causa della velocità del processo di produzione.
TECNICHE DI PROTOTIPAZIONE RAPIDA		
3D printing	<ul style="list-style-type: none"> • Elevato controllo sulla micro e macrostruttura dello scaffold. • Permette di creare scaffold con strutture 3D complesse e ad alta risoluzione. 	<ul style="list-style-type: none"> • Limitata a pochi materiali a causa delle alte temperature originate dal processo di produzione. • La rimozione delle polveri nelle parti in profondità è complicata e, in alcuni casi, richiede l'impiego di solventi organici.
Selective laser sintering	<ul style="list-style-type: none"> • Permette di creare scaffold con strutture 3D complesse • È veloce ed economicamente vantaggiosa • Non impiega solventi 	<ul style="list-style-type: none"> • Rispetto alla 3D printing la vitalità delle cellule è inferiore (15). • La rimozione della polvere in eccesso richiede passaggi aggiuntivi

Stereolithography	<ul style="list-style-type: none"> • È veloce e permette di creare una grande varietà di forme. 	<ul style="list-style-type: none"> • Limitata disponibilità di fotopolimeri biocompatibili.
Fused deposition modelling	<ul style="list-style-type: none"> • Produce scaffold ad elevata porosità e con buona rigidezza. • Non impiega solventi tossici. 	<ul style="list-style-type: none"> • Limitata disponibilità di materiali termoplastici biocompatibili.

Tabella 1.4: Vantaggi e svantaggi delle tecniche convenzionali e di prototipazione rapida per la fabbricazione degli scaffold.

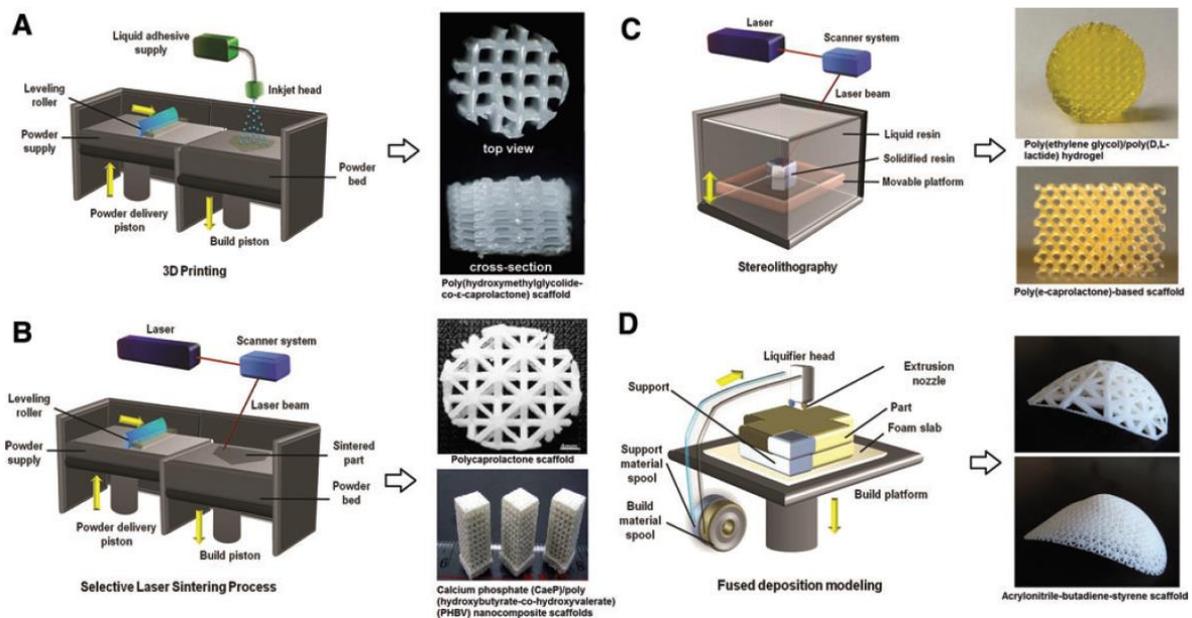


Figura 1.9: Rappresentazione schematica delle tecniche di prototipazione rapida ed immagini degli scaffold realizzati con ognuna di esse. (A) 3D printing, (B) selective laser sintering, (C) stereolithography e (D) fused deposition modelling. Figura riprodotta da (12).

Uno dei principali limiti degli attuali sistemi di coltura 3D è rappresentato dalla mancanza del complesso sistema vascolare che, nei tessuti *in vivo*, si occupa del trasporto di ossigeno e nutrienti e della rimozione di prodotti di scarto. Questi processi sono realizzati solo attraverso la diffusione che, negli sferoidi di grandi dimensioni, risulta però

inadeguata (6). Come si può notare in figura 1.10, negli sferoidi 3D le cellule si trovano in stadi cellulari differenti: negli strati più esterni, a diretto contatto con ossigeno e nutrienti, le cellule crescono e proliferano e riescono ad eliminare con facilità i prodotti di scarto. Spostandosi verso il nucleo si passa ad uno stato intermedio di quiescenza fino ad arrivare ad una zona necrotica a causa della notevole presenza dei prodotti di scarto e della mancanza di ossigeno e nutrienti che non riescono a penetrare in profondità.

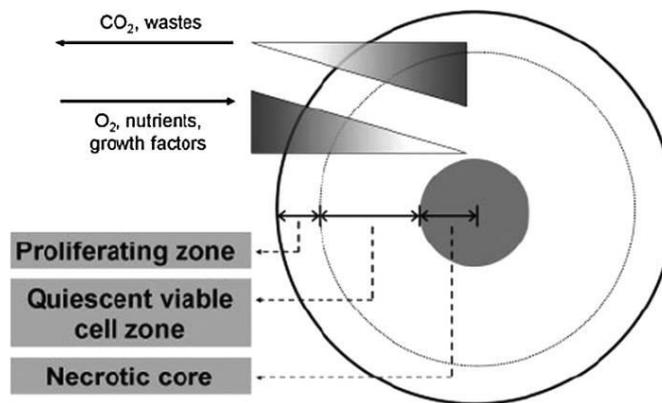


Figura 1.10: Diagramma schematico delle zone di proliferazione, quiescenza e necrotiche in uno sferoide 3D. Figura riprodotta da (6).

Per cercare di superare questi limiti e garantire una distribuzione più uniforme dei nutrienti, ci si avvale dell'utilizzo di bioreattori.

1.4 Bioreattore

Il bioreattore è un attuatore meccanico in grado di influenzare i processi biologici (17). Può anche essere definito come “un dispositivo in cui si sviluppano processi chimici e/o biochimici in un ambiente e sotto condizioni operative (pressione, temperatura, pH, nutrienti, prodotti di scarto) altamente controllati” (18) .

In alcuni ambiti, come quello farmaceutico, si usano i bioreattori per aumentare i volumi di coltura e quindi moltiplicare, anche su scala industriale (per esempio nella produzione di anticorpi), il numero delle cellule. In altri contesti, compreso quello di nostro interesse dell'ingegneria tissutale, si sfrutta il bioreattore per la crescita di cellule e tessuti; attraverso l'applicazione di stimoli biochimici e meccanici si cerca infatti di indurre la crescita e il differenziamento cellulare.

Come rappresentato in figura 1.11, i bioreattori attualmente più diffusi nel campo dell'ingegneria dei tessuti sono:

- **Spinner flask** (figura 1.11a): sono composti da una camera (riempita con uno specifico terreno di coltura) all'interno della quale uno o più scaffold sono inseriti e sospesi tramite degli aghi. La rotazione di una barretta magnetica, posta all'interno della camera, mette in movimento il medium nel quale gli scaffold sono immersi e genera moti convettivi (17).
- **Bioreattore a pareti rotanti** (figura 1.11b): in questo tipo di bioreattori gli scaffold sono lasciati liberi all'interno di una camera cilindrica, riempita con il terreno di coltura. La rotazione delle pareti della camera genera una forza idrodinamica che si bilancia con quella gravitazionale e permette agli scaffold di rimanere in sospensione. La velocità di rotazione viene aumentata in maniera proporzionale allo sviluppo di nuovo tessuto per mantenere la sospensione degli scaffold (17). Sono utilizzati per la realizzazione di costrutti di forma cilindrica come i vasi sanguigni.
- **Bioreattori a perfusione** (figura 1.11c): sono tra i bioreattori più usati nel campo dell'ingegneria tissutale. Lo scaffold viene fissato all'interno di un tubo riempito con il terreno di coltura; attraverso l'utilizzo di pompe si genera un flusso laminare monodirezionale all'interno della camera che attraversa lo scaffold nella sua totalità (19).
- **Bioreattori a compressione** (figura 1.11d): particolarmente utilizzati per la realizzazione di tessuto osseo e cartilagineo, questi bioreattori permettono di applicare sollecitazioni statiche (quindi compressioni costanti nel tempo) oppure dinamiche, a frequenze variabili. Un motore, guidato da un sistema di controllo, trasferisce lo stimolo agli scaffold immersi nel terreno di coltura.

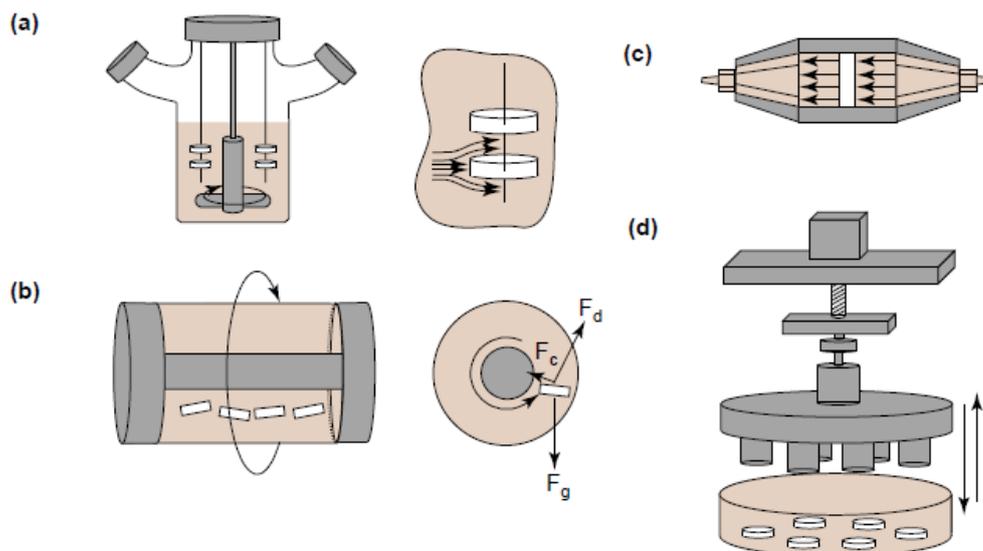


Figura 1.11: Tipi di bioreattore: (a) spinner flask, (b) a pareti rotanti, (c) a perfusione, (d) a compressione. Figura riprodotta con modifiche da (18).

In tabella 1.5 si elencano i vantaggi e gli svantaggi dei vari tipi di bioreattore.

Bioreattore	Vantaggi	Svantaggi
Spinner flask	<ul style="list-style-type: none"> • I moti convettivi favoriscono il trasporto di ossigeno e nutrienti e la rimozione dei tessuti dei prodotti di scarto. 	<ul style="list-style-type: none"> • Le cellule in profondità nello scaffold ricevono quantità limitate di ossigeno e nutrienti portandole a migrare verso l'esterno o alla morte. • I moti convettivi generano vertici che potrebbero risultare dannosi per la formazione di tessuto (18). • Stimoli meccanici od elettrici non applicabili
A pareti rotanti	<ul style="list-style-type: none"> • Distribuzione di cellule più uniforme nello scaffold (17). 	<ul style="list-style-type: none"> • Le cellule in profondità nello scaffold ricevono quantità limitate di ossigeno e

	<ul style="list-style-type: none"> • I moti convettivi favoriscono il trasporto di ossigeno e nutrienti e la rimozione dei prodotti di scarto. 	<p>nutrienti portandole a migrare verso l'esterno o alla morte.</p>
A perfusione	<ul style="list-style-type: none"> • Distribuzione di cellule più uniforme nello scaffold (17) . • Rispetto ai due bioreattori precedenti garantisce una distribuzione più omogenea del fluido (e quindi di ossigeno e nutrienti) nello scaffold, arrivando fino al suo nucleo. 	<ul style="list-style-type: none"> • Sforzi di taglio eccessivi possono compromettere la stabilità dello scaffold e la vitalità delle cellule: è necessario regolare con cura la portata.
A compressione	<ul style="list-style-type: none"> • Favoriscono la crescita della matrice extracellulare. • Possono indurre fenotipi cellulari differenti a seconda dell'entità della sollecitazione. 	<ul style="list-style-type: none"> • Sollecitazioni eccessive possono compromettere la stabilità dello scaffold e la vitalità delle cellule: è necessario regolare con cura l'entità della compressione.

Tabella 1.5: Vantaggi e svantaggi dei principali bioreattori nell'ingegneria dei tessuti.

La combinazione dei precedenti tipi di bioreattore permette di ottenere benefici ancora maggiori nella riproduzione, *in vitro*, dell'ambiente e del comportamento cellulare e di ottenere quindi risultati migliori nella realizzazione di tessuti. Un esempio di questo tipo di bioreattori, presentato in figura 1.12, combina perfusione e compressione. La prima permette di migliorare gli scambi di ossigeno e nutrienti e la rimozione dei prodotti di scarto negli scaffold mentre la compressione favorisce il differenziamento nel fenotipo osseo (20). Il bioreattore in questione è un apparato *stand-alone* dotato di un sistema

automatico per la sostituzione del terreno di coltura e di ulteriori dispositivi in grado di mantenere livelli costanti di temperatura e pH. La perfusione è realizzata attraverso l'utilizzo di due pompe peristaltiche mentre la compressione è applicata tramite un attuatore meccanico basato su un motore passo-passo. Questo bioreattore consente anche di effettuare analisi real-time/in-line (come la spettrofluorimetria o l'analisi della fluorescenza) in totale sicurezza, senza il rischio di infezioni o perdite, perché è dotato di unità mobili per alloggiare gli scaffold che possono essere rimosse per eseguire le analisi necessarie.

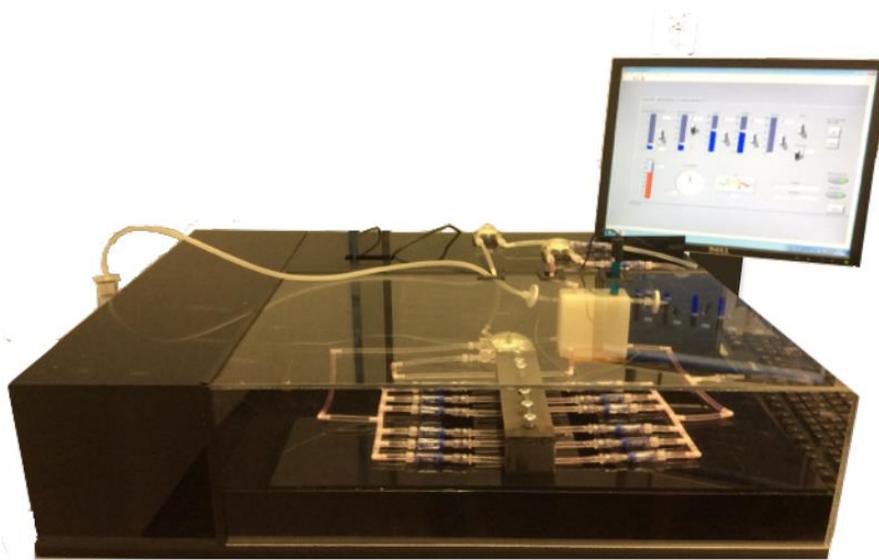


Figura 1.12: Bioreattore a perfusione/compressione. Figura riprodotta da (20).

1.5 Metodi Computazionali

I modelli computazionali sono modelli matematici che, attraverso l'ausilio della simulazione computerizzata, analizzano il comportamento di sistemi complessi.

Negli ultimi decenni, in campo biologico (ma anche medico o farmaceutico) è stata acquisita una grande quantità di dati, che risultano complessi da gestire ed analizzare: “la complessità funzionale degli organismi viventi è molto superiore rispetto alla capacità umana di analisi” (21). L'utilizzo dei modelli computazionali permette di comprendere più approfonditamente i sistemi viventi, di predirne o controllarne i comportamenti e di elaborare con efficacia grandi quantitativi di dati sperimentali.

Di seguito sono riportati alcuni tra i numerosi strumenti computazionali ideati per scopi biologici:

- The Virtual Cell è un software computazionale sviluppato all'Università del Connecticut (USA) che permette di costruire modelli cellulari compartimentali o spaziali e simularne il loro comportamento. I modelli spaziali, la cui geometria può anche essere ricavata sperimentalmente, si possono realizzare in una, due o tre dimensioni. Attraverso un'interfaccia grafica l'utente può selezionare le molecole, le reazioni e le strutture necessarie per riprodurre il modello cellulare di interesse. Il software si occupa delle simulazioni a partire dal modello creato dall'utente ed i risultati ottenuti possono essere confrontati direttamente con i dati sperimentali (22).
- The Ising Model è un modello matematico-statistico che è stato ampiamente utilizzato per lo studio dei tumori. In particolare, è definito come un modello di automa cellulare 4D (tre dimensioni spaziali ed una temporale) ed è stato applicato alla descrizione delle dinamiche di crescita di un tumore cerebrale (il glioblastoma) in funzione del tempo attraverso l'utilizzo di un numero minimo di parametri (23). Il processo di simulazione si compone di tre parti: generazione dell'automa cellulare, applicazione di un algoritmo di proliferazione (figura 1.13) e analisi dell'effetto del trattamento (introdotto come un impulso periodico). L'automa cellulare è un modello discreto che si compone di una griglia all'interno della quale sono contenute le cellule sane che, attraverso l'utilizzo di regole, possono transitare tra stati differenti (proliferativo, ipossico e necrotico) e trasformarsi in cellule tumorali.

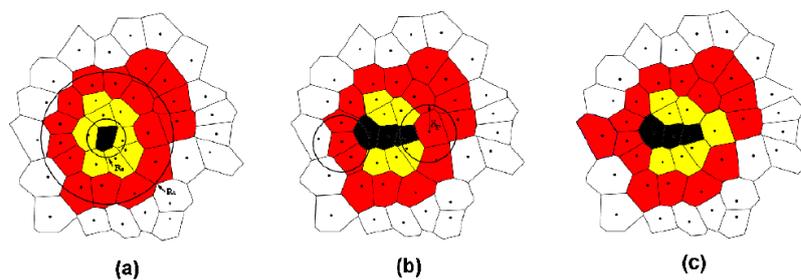


Figura 1.13: Illustrazione dell'algoritmo di proliferazione attraverso una sezione del tumore. (a) Il tumore contiene cellule necrotiche (in nero), cellule non proliferative (giallo) e proliferative (rosso). (b) Due cellule non proliferative sono diventate necrotiche; due cellule proliferative sono selezionate perché hanno un'alta probabilità di divisione. (c) Una delle due cellule selezionate divide ed un'altra diventa non proliferativa. Figura riprodotta da (23).

- Il modello computazionale descritto in (24) predice la crescita delle cellule e della matrice extracellulare all'interno degli scaffold e fornisce informazioni spaziotemporali sulla forma finale del costruito e sulla velocità di riempimento dei pori da parte delle cellule. Per confrontare i risultati della simulazione con quelli sperimentali, sono stati seminati scaffold di varie geometrie (esagonale, quadrata e triangolare) con cellule derivate dal periostio (una guaina che riveste il tessuto osseo) e posti in coltura per 14 giorni (24) per favorire la crescita di tessuto osseo, usato come variabile di uscita. Il confronto qualitativo (figura 1.14) tra i risultati *in silico* e *in vivo* dimostra una corrispondenza in termini di forma e porosità.

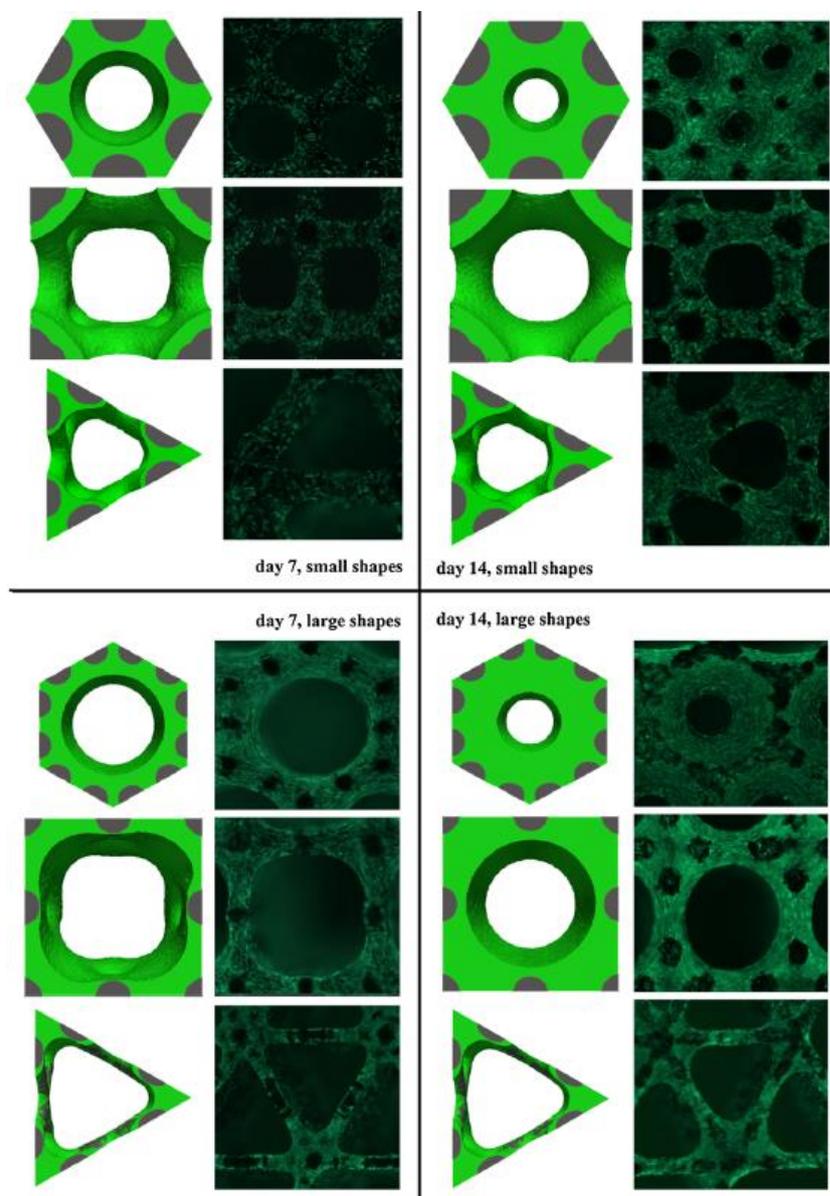


Figura 1.14: Confronto quantitativo tra simulazioni (sfondo bianco) ed esperimenti (sfondo nero) in scaffold con pori piccoli (da 0.5 mm) e larghi (1 mm) al giorno 7 e al giorno 14. Figura riprodotta da (24).

1.6 SALSA

SALSA (ScAffoLd SimulAtor) è uno strumento computazionale *general purpose* in grado di simulare il comportamento di una popolazione di cellule in coltura in uno scaffold 3D (25). Questo software è stato realizzato dall'ing. Marilisa Cortesi, correlatrice della presente tesi di laurea, con lo scopo di facilitare l'utilizzo dei sistemi di coltura 3D ed ottimizzarne l'analisi. Molti test e protocolli, infatti, sono adattati da quelli sviluppati per le tradizionali colture bidimensionali e quindi il loro utilizzo su scaffold 3D pone notevoli difficoltà (25).

Una delle caratteristiche salienti di SALSA è la sua programmabilità; a differenza degli strumenti computazionali attualmente diffusi, che sono molto specifici e hanno un'applicabilità limitata, in SALSA l'utente può scegliere numerose caratteristiche quali il tipo di cellula, il tipo di scaffold o il tipo di trattamento così come i rispettivi quantitativi e numerosi altri parametri.

SALSA può affiancarsi all'attività sperimentale integrandola. Il processo di simulazione risulta veloce e permette di avviare simulazioni multiple per testare tutte le possibili configurazioni di un esperimento per poi realizzare, in laboratorio, solo quelle le cui simulazioni forniscono esiti soddisfacenti, riducendo notevolmente costi e tempi.

SALSA utilizza come formalismo matematico un automa cellulare continuo e discreto. Questo sistema permette di descrivere sistemi dinamici complessi (26) e si compone di una griglia (o matrice) n-dimensionale costituita da celle. Ogni cella è caratterizzata da uno stato, che fa parte di un insieme finito di configurazioni possibili per il sistema, e ne caratterizza il comportamento. L'evoluzione di ogni cella e dell'automa è scandita da passi temporali discreti e dipende da regole di transizione. Lo stato di una cella in un dato istante di tempo ($t+1$) dipende dallo stato della cella al tempo precedente (t) e dagli stati delle cellule del proprio intorno al tempo precedente (t). Gli stati di tutte le cellule sono aggiornati in maniera sincrona.

SALSA si avvale di matrici discrete per descrivere la posizione e il comportamento delle cellule nello scaffold; le matrici continue sono utilizzate per la descrizione delle proprietà meccaniche dello scaffold e della distribuzione dei nutrienti (25). L'evoluzione delle cellule tra stati differenti e le interazioni tra cellule ed ambiente sono regolate da un sistema di regole ambientali e di transizione.

Il processo di simulazione si compone di 3 fasi:

- Fase iniziale: si carica il file di configurazione.
- Fase intermedia: si avvia la simulazione che viene ripetuta ciclicamente; ad ogni ripetizione si aggiorna lo stato delle cellule e le variabili ambientali.
- Fase finale: i risultati ottenuti sono salvati in fogli di testo facilmente consultabili.

I file di configurazione sono fogli di testo suddivisi in due sezioni principali: modello e condizioni iniziali che permettono di definire le caratteristiche del modello. La prima sezione si compone delle seguenti parti:

- Cell types: si specifica la linea cellulare utilizzata e si definisce l'insieme di stati che la cellula può assumere (per esempio proliferante, quiescente o morta) assegnando ad ognuno di essi un numero intero identificativo.
- Rules: all'interno di questa sottosezione sono elencate le regole ambientali e quelle di transizione che saranno descritte più nel dettaglio nel paragrafo 2.3.2. Ad ogni regola si associa una equazione che calcola la probabilità con cui la regola potrebbe applicarsi.
- Scaffold: si definiscono le caratteristiche dello scaffold quali il materiale, la dimensione, la porosità ed il numero di strati.

Nella sezione condizioni iniziali sono presenti due parti:

- Cell types: specifica il quantitativo percentuale di cellule per ogni stato cellulare e il numero totale di cellule.
- Scaffold: specifica il tipo di semina delle cellule, il numero di iterazioni della simulazione che corrisponde alla durata dell'esperimento (in ore), il tipo di terreno di coltura e la modalità con cui viene sostituito.

Nell'appendice A si può consultare un file di configurazione completo.

Per la realizzazione dei codici necessari alla simulazione si è utilizzato il linguaggio di programmazione Python. A partire dalle specifiche contenute nel file di configurazione selezionato, SALSA crea il modello e avvia la simulazione durante la quale vengono caricati altri file di testo che contengono informazioni utili circa il materiale utilizzato per lo scaffold (modulo di Young) e il tipo di terreno di coltura (concentrazione dei componenti).

Ogni iterazione inizia aggiornando le concentrazioni di glucosio e di ossigeno in ogni cella dello scaffold; sono poi calcolate le probabilità associate al verificarsi di ogni regola ed i risultati ottenuti sono normalizzati in modo che la somma di tutte le probabilità sia 1. Successivamente, per aggiornare lo stato di ogni cellula, si eseguono tutte le regole ambientali e una delle regole di transizione in base al valore di probabilità (25).

Al termine di ogni iterazione sono salvate, in file di testo distinti, le principali variabili della simulazione. Al termine della simulazione SALSA crea quattro file di output: age, cell, nutrient, tld, Young modulus in cui, per ogni iterazione e per ogni punto dello scaffold (descritto da coordinate X, Y e Z) sono specificati rispettivamente l'età della cellula, lo stato della cellula, la concentrazione del farmaco, la concentrazione di nutrienti, il tempo trascorso dall'ultima divisione e il modulo di Young (che dà indicazioni circa la rigidità dello scaffold).

1.7 Modello Biologico

Nel presente lavoro di tesi si è scelto di lavorare con scaffold di alginato e cellule staminali e di favorire il differenziamento di queste ultime nel fenotipo osseo attraverso la stimolazione meccanica.

1.7.1 Scaffold di alginato

Come precedentemente descritto, l'alginato è uno dei materiali attualmente impiegati nella fabbricazione degli scaffold, anche nel Laboratorio di Ingegneria Cellulare e Molecolare "S. Cavalcanti" della UOS DEI di Cesena. Questa disponibilità e le sue qualità ci hanno spinto a selezionarlo per la realizzazione di questa tesi.

L'alginato è un polimero naturale estratto dalle alghe brune e dai batteri; è caratterizzato da buona biocompatibilità, biodegradabilità, bassa tossicità e costi relativamente contenuti (27). Si presenta in forma fibrosa o granulare e ha un colore che spazia dal bianco al marrone. È composto da monomeri di acido D-mannuronico che si connettono a formare i blocchi M e monomeri di acido L-guluronico che originano i blocchi G. Il polimero nasce dall'alternanza di blocchi M e blocchi G (figura 1.15).

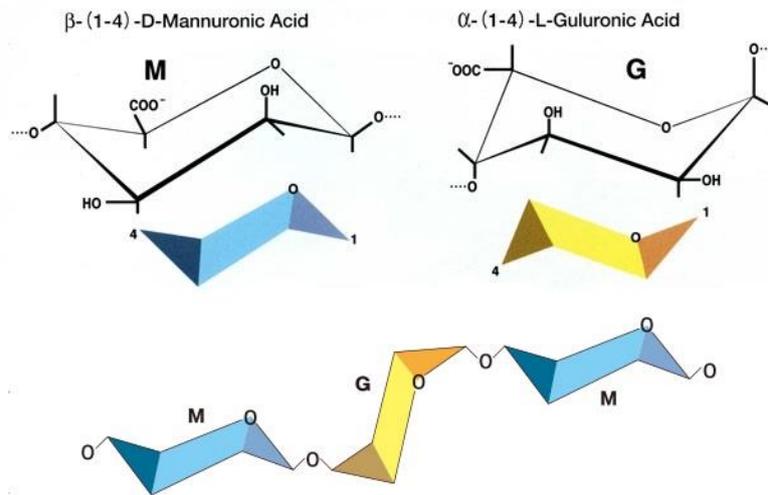


Figura 1.15: Struttura chimica alginato.

La gelificazione dell'alginato è reversibile, può avvenire in soluzione acquosa ed è favorita da cationi divalenti come il Ca^{++} che, attraverso legami ionici, possono legare i blocchi G (28). In questo caso si parla di alginato di sodio.

La tecnica self-assembly con cui viene realizzato lo scaffold di alginato nel laboratorio "S. Cavalcanti" è descritta nel dettaglio in (29).

1.7.2 Cellule Staminali

Le cellule staminali sono cellule dall'alta capacità proliferativa caratterizzate dalle seguenti proprietà:

- non possiedono alcuna specializzazione funzionale o strutturale.
- Possono replicarsi per numerosi cicli e mantenere il proprio stato indifferenziato
- Possono differenziare in uno o più tipi cellulari (potenza) (figura 1.16).

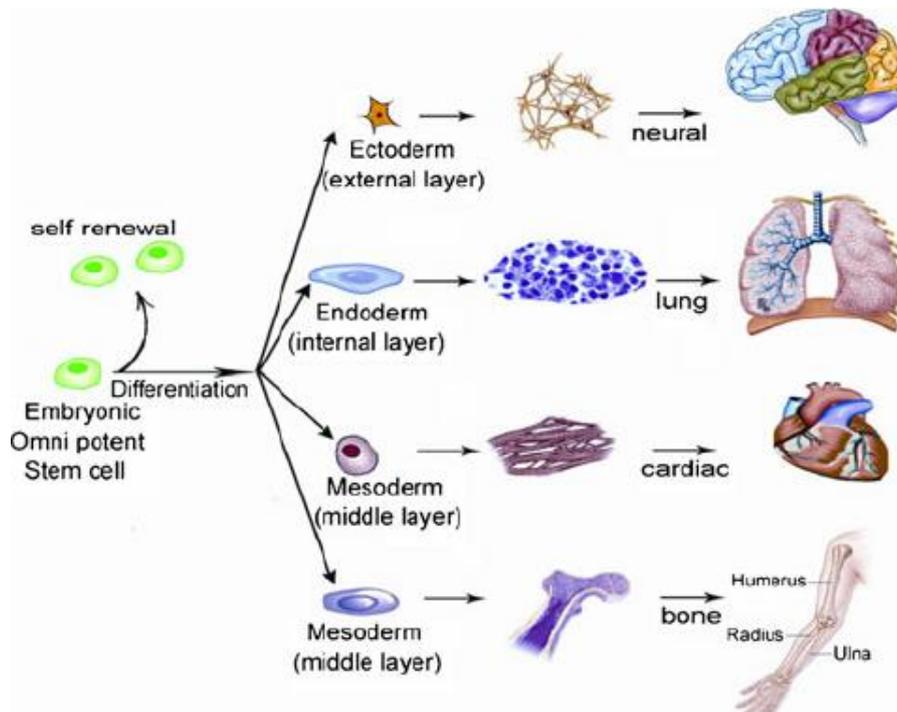


Figura 1.16: Processo di differenziamento di cellule staminali embrionali. Figura riprodotta da (30)

Le cellule staminali, in base al grado di potenza posseduto, si classificano in:

- Totipotenti: possono differenziare in tutti i tipi cellulari presenti nell'organismo; solo lo zigote e cellule derivate dalle prime divisioni dell'ovulo fecondato appartengono a questa categoria.
- Pluripotenti: possono differenziare in uno dei tre stati germinali (endoderma, mesoderma, ectoderma) e derivano dalle totipotenti.
- Multipotenti: possono differenziare in un numero limitato di tipi cellulari e sostituiscono cellule differenziate che vengono perse. Le cellule del midollo osseo o quelle del sangue del cordone ombelicale rientrano tra le staminali multipotenti.
- Unipotenti: si differenziano in un unico tipo cellulare.

Le cellule staminali maggiormente utilizzate nell'ingegneria dei tessuti sono le cellule staminali embrionali umane (hESC) e le cellule staminali mesenchimali umane (hMSC). Le prime sono staminali pluripotenti e quindi hanno uno spettro di differenziamento più ampio. Nonostante questo, il loro utilizzo è limitato da numerose problematiche come le preoccupazioni etiche, il possibile sviluppo di tumori, una limitata conoscenza dei loro processi differenziativi e le incompatibilità immunologiche (31). Le hMSC sono cellule

staminali multipotenti presenti nel midollo osseo adulto in grado di differenziare in cellule connettivali (adipociti, osteociti e condrociti). Presentano numerosi vantaggi rispetto alle altre linee cellulari staminali: sono facilmente reperibili e comportano problematiche etiche più limitate, la loro espansione e moltiplicazione *in vitro* è semplice, non inducono reazioni immunologiche. Il loro principale svantaggio, rappresentato dal fatto che possono andare incontro ad un numero limitato di divisioni cellulari, limita la possibile insorgenza di cellule tumorali (32).

1.7.3 Stimolazione meccanica per la formazione di tessuto osseo

L'induzione del fenotipo osseo nelle cellule staminali richiede l'ausilio di segnali regolatori essenziali di tipo biochimico o biomeccanico (33).

Il tessuto osseo è un tessuto connettivo specializzato con funzione di sostegno. È costituito da una parte organica (30%) formata dalle cellule e dalla matrice extracellulare in cui sono immerse e da una parte inorganica (70%) composta da numerosi sali minerali.

La rigenerazione ossea è il processo fisiologico di formazione dell'osso che entra in azione non solo durante le fasi di guarigione di una frattura ma anche nell'intera vita dell'adulto per garantire un rimodellamento continuo dell'apparato scheletrico. Vi sono delle condizioni cliniche (traumi, infezioni, tumori, anomalie scheletriche) che possono causare una perdita considerevole di tessuto osseo e rendono insufficiente il naturale processo di rigenerazione (34). Le tecniche attualmente in uso per sopperire a questa mancanza tra cui l'innesto osseo autologo (che rappresenta il gold standard) od allogenico e l'utilizzo di fattori di crescita, presentano svantaggi e limitazioni. L'innesto autologo necessita di una seconda operazione per prelevare il tessuto osseo dal paziente, che potrebbe manifestare dolore, deformità e cicatrici nel sito di raccolta ed andare incontro ai classici rischi associati agli interventi chirurgici quali sanguinamento, infiammazioni ed infezioni (35). Nell'innesto allogenico il donatore ed il ricevente sono persone diverse; a differenza del trapianto autologo, ci sono rischi connessi a reazioni immunitarie e trasmissione di infezioni.

L'intensa attività di ricerca nel campo dell'ingegneria tissutale punta a superare queste difficoltà e a trovare delle strategie per accelerare il processo di riparazione e promuovere l'osteogenesi *in situ*. Uno dei metodi proposti per raggiungere questo scopo si basa sull'utilizzo di cellule staminali che possono differenziare in tessuto osseo. In numerosi

studi si è osservato che l'utilizzo di scaffold di alginato impiantabili, seminati con cellule staminali, conduce ad una promettente crescita tissutale (36) (figura 1.17).

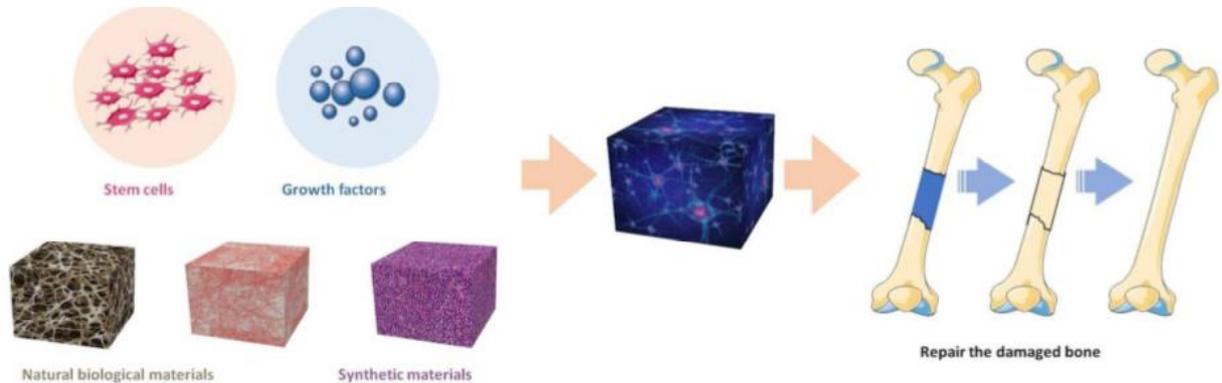


Figura 1.17: Scaffold naturali od artificiali con a bordo cellule staminali e fattori di crescita sviluppano tessuto osseo che si innesta nel sito danneggiato per favorire la riparazione. Figura riprodotta da (37).

La stimolazione meccanica regola il rimodellamento e la rigenerazione ossea; il tessuto osseo è fisiologicamente sottoposto a forze meccaniche multiple: deformazione, pressione, flusso di fluidi, sforzi di taglio o di torsione. È stato dimostrato, in numerosi studi, che l'uso indipendente o la combinazione di queste forze, su costrutti 3D *in vitro*, incentiva la proliferazione e il differenziamento cellulare (38).

In particolare, la compressione ciclica di scaffold con a bordo cellule staminali, sotto opportune condizioni operative, risulta favorire il processo di induzione del fenotipo osseo (39; 40).

La stimolazione meccanica degli scaffold 3D viene realizzata attraverso l'utilizzo di specifici bioreattori.

1.8 Scopo

Il presente lavoro di tesi si propone di estendere SALSA, integrando in questo simulatore la possibilità di stimolare meccanicamente gli scaffold. La compressione meccanica, infatti, è risultata efficace nell'induzione del differenziamento osseo di cellule staminali (39). Questo approccio, che risulta meno invasivo e più fisiologico rispetto all'induzione chimica, ha maggiori possibilità di applicazioni in ambito riabilitativo e di ingegneria dei tessuti, ma risulta anche più complesso e difficile da ottimizzare. Di conseguenza l'utilizzo di SALSA in questo ambito sarebbe particolarmente utile e permetterebbe di sfruttare al meglio questa stimolazione *in-vitro*.

Di conseguenza nel seguito verrà descritto come:

- Simulare, tramite SALSA, la stimolazione meccanica dello scaffold di alginato seminato con cellule staminali.
- Analizzare la risposta delle cellule a tali sollecitazioni.
- Trovare il set up ottimale per favorire il differenziamento in fenotipo osseo delle cellule staminali per poterlo sfruttare in protocolli sperimentali.

2. MATERIALI E METODI

SALSA è uno strumento computazionale che permette di descrivere il comportamento di una popolazione di cellule all'interno di uno scaffold 3D. Il presente lavoro di tesi si inserisce all'interno di questo progetto aggiungendo una sezione dedicata alla simulazione del processo di compressione dello scaffold.

Grazie alla programmabilità di questo strumento computazionale, abbiamo potuto scegliere il set up sperimentale reputato più idoneo per i nostri scopi: uno scaffold di alginato seminato con cellule staminali. I passaggi necessari per la modellazione del processo di stimolazione meccanica, la sua implementazione ed integrazione con SALSA sono descritti nei prossimi paragrafi.

2.1 Teoria dell'elasticità

Consideriamo lo scaffold di alginato un solido elastico lineare; nei materiali che presentano queste proprietà vi è una proporzionalità diretta tra tensione e deformazione (linearità) e il recupero completo delle dimensioni originali una volta che il carico viene rimosso (elasticità).

Per la modellazione matematica del processo di compressione meccanica dello scaffold si è scelto quindi di utilizzare la teoria classica dell'elasticità (o teoria dell'elasticità lineare); questa branca della meccanica si occupa della determinazione dello stato di deformazione e dello stato tensionale dei corpi solidi sottoposti a condizioni di carico, in regime di piccoli spostamenti e di piccole deformazioni.

La formulazione matematica usata per descrivere gli spostamenti e le deformazioni che la stimolazione meccanica genera nello scaffold di alginato e la distribuzione delle tensioni che ne consegue, fa uso delle seguenti equazioni generali (41):

- Equazioni spostamento-deformazione:

$$\varepsilon = \frac{1}{2}[(\nabla u) + (\nabla u)^T] \quad (1)$$

- Equazioni costitutive:

$$\sigma = C : \varepsilon \quad (2)$$

- Equazioni del moto:

$$\nabla \cdot \sigma + F = \rho \ddot{u} \quad (3)$$

in cui:

- ε è il tensore simmetrico delle deformazioni: $\varepsilon = \begin{pmatrix} \varepsilon_x & \varepsilon_{xy} & \varepsilon_{xz} \\ \varepsilon_{xy} & \varepsilon_y & \varepsilon_{yz} \\ \varepsilon_{xz} & \varepsilon_{yz} & \varepsilon_z \end{pmatrix}$; i tre elementi della diagonale sono le deformazioni normali, gli altri sei elementi sono le deformazioni di taglio.
- u è il vettore degli spostamenti: $u(x, y, z), v(x, y, z), w(x, y, z)$
- σ è il tensore simmetrico degli sforzi: $\sigma = \begin{pmatrix} \sigma_x & \sigma_{xy} & \sigma_{xz} \\ \sigma_{xy} & \sigma_y & \sigma_{yz} \\ \sigma_{xz} & \sigma_{yz} & \sigma_z \end{pmatrix}$; i tre elementi della diagonale sono le tensioni normali, gli altri sei elementi sono le tensioni di taglio.
- C è il tensore dei coefficienti elastici.
- ρ è la densità di volume.
- F sono le forze per unità di volume.

Le ipotesi semplificative adottate sono le seguenti:

- si considera lo scaffold come un solido elastico isotropo (le sue proprietà meccaniche sono indipendenti dalla direzione).
- Si considerano presenti solo sforzi normali (gli sforzi di taglio sono trascurabili).
- Le forze per unità di volume (F) sono assenti.
- La compressione dello scaffold avviene in direzione z , in accordo con il sistema di riferimento in figura 2.1:

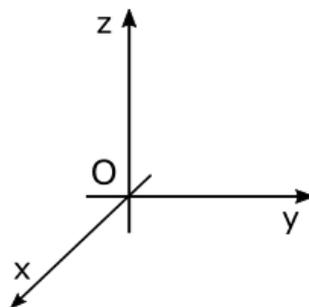


Figura 2.1: Sistema di riferimento adottato.

Applicando le precedenti ipotesi, le equazioni generali (1), (2) e (3) si semplificano come segue (42):

- Equazioni spostamento-deformazione:

$$\varepsilon_x = \frac{\partial u}{\partial x}, \quad \varepsilon_y = \frac{\partial v}{\partial y}, \quad \varepsilon_z = \frac{\partial w}{\partial z} \quad (4)$$

$$\varepsilon_x = \frac{u^{t+1} - u^t}{u^t}, \quad \varepsilon_y = \frac{v^{t+1} - v^t}{v^t}, \quad \varepsilon_z = \frac{w^{t+1} - w^t}{w^t} \quad (5)$$

- Equazioni costitutive:

$$\sigma_x = \lambda(\varepsilon_x + \varepsilon_y + \varepsilon_z) + 2G\varepsilon_x \quad (6)$$

$$\sigma_y = \lambda(\varepsilon_x + \varepsilon_y + \varepsilon_z) + 2G\varepsilon_y \quad (7)$$

$$\sigma_z = \lambda(\varepsilon_x + \varepsilon_y + \varepsilon_z) + 2G\varepsilon_z \quad (8)$$

in cui λ e G sono le costanti elastiche di Lamé, legate ad E (modulo di Young, paragrafo 2.3.3.1.) e ν (coefficiente di Poisson, paragrafo 2.3.4.2) attraverso le relazioni:

$$\lambda = \frac{Ev}{(1 + \nu)(1 - 2\nu)}, \quad G = \frac{E}{2(1 + \nu)} \quad (9)$$

- Equazioni del moto:

$$\frac{\partial^2 u}{\partial t^2} = \frac{1}{\rho} \frac{\partial \sigma_x}{\partial x}, \quad \frac{\partial^2 v}{\partial t^2} = \frac{1}{\rho} \frac{\partial \sigma_y}{\partial y}, \quad \frac{\partial^2 w}{\partial t^2} = \frac{1}{\rho} \frac{\partial \sigma_z}{\partial z} \quad (10)$$

2.2 Implementazione in SALSA

Per poter simulare il processo di compressione dello scaffold il codice di SALSA è stato modificato, integrando nel processo di simulazione la computazione della distribuzione della tensione lungo le tre direzioni dello scaffold. Questo calcolo sfrutta alcune variabili fondamentali del sistema (come ad esempio il modulo di Young) e si sviluppa seguendo

i passaggi fondamentali descritti nel seguito e rappresentati nello schermo a blocchi in figura 2.2.

- 1- La grandezza di input è rappresentata dalla deformazione percentuale fornita dal bioreattore.
- 2- Calcolo dello spostamento iniziale lungo le tre direzioni al tempo t (u^t, v^t e w^t).
- 3- Calcolo della deformazione lungo le tre direzioni ($\varepsilon_x, \varepsilon_y$ ed ε_z) attraverso le equazioni spostamento-deformazione (5);
- 4- Calcolo delle tensioni lungo le tre direzioni (σ_x, σ_y e σ_z) attraverso le equazioni costitutive (6), (7), (8) utilizzando le costanti di Lamé (9) ricavate a partire dal valore del modulo di Young nell'iterazione corrente, fornito da SALSAS;
- 5- I valori delle tensioni lungo le tre direzioni (σ_x, σ_y e σ_z) sono salvati in appositi file di output.

Questi passaggi sono eseguiti all'interno della stessa iterazione per un numero di volte corrispondente al numero di compressioni effettuate nell'unità di tempo (1ora) alla frequenza di stimolazione scelta.

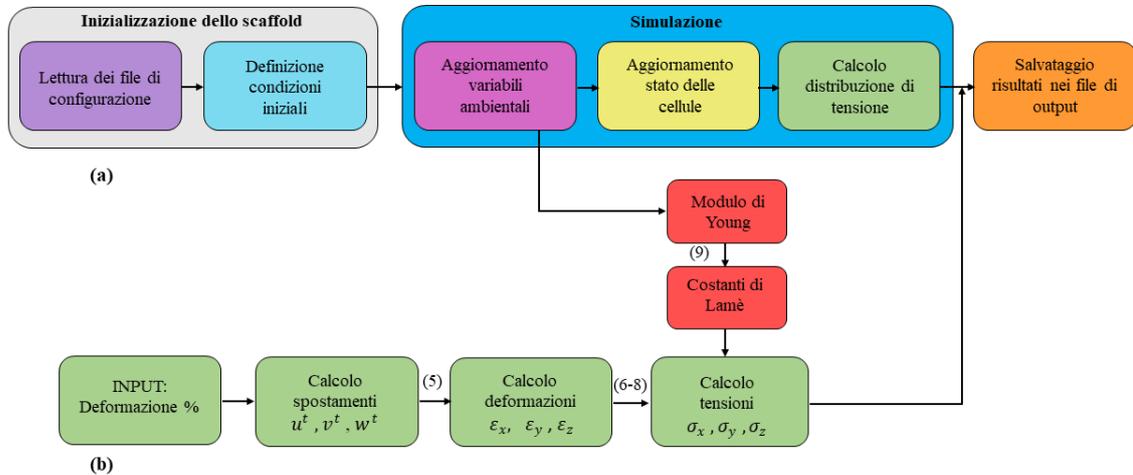


Figura 2.2: Lo schema a blocchi in figura (a), riportato con modifiche da (25) descrive le tre fasi del processo di simulazione di SALSAS. In figura (b) sono esplicitate le componenti del blocco “Calcolo distribuzione di tensione” in (a).

Nella fase iniziale di test, supponendo una compressione continuativa dello scaffold, le equazioni (10) sono state sfruttate per calcolare lo spostamento all'istante successivo

(u^{t+1} , v^{t+1} e w^{t+1}). Successivamente, gli spostamenti calcolati al passo precedente sono utilizzati per ripetere gli step 3,4 e 5.

2.3 File di configurazione

Come descritto nel paragrafo 1.6, una parte importante del processo di simulazione è rappresentata dalle specifiche contenute nel file di configurazione.

Mantenendo la struttura dei file originali, sono stati creati nuovi file di configurazione specifici per i nostri scopi. Per modellare il processo di compressione è stato necessario aggiungere una sottosezione in “Modello” rinominata “Stress”. Di seguito le principali modifiche e novità introdotte.

2.3.1 Cell types

Gli stati cellulari che le cellule staminali possono assumere sono identificati da un numero intero: 1 per le cellule morte, 2 per le cellule staminali, 3 per le cellule differenziate (figura 2.3a). Questo numero identificativo viene utilizzato nelle regole di transizione e nei file di output. La simulazione parte con un totale di 5 milioni di cellule, tutte staminali (figura 2.3b). Questo è il quantitativo di cellule con cui si semina lo scaffold negli esperimenti *in vitro*; un numero così elevato di cellule allungherebbe notevolmente i tempi di simulazione. Per questo motivo SALSA, sfruttando il volume della cellula eucariotica media ($4.2 \cdot 10^{-6} \text{ mm}^3$) e la capacità totale della matrice *in-silico*, crea una proporzione tra cellule reali e cellule virtuali per calcolare la cardinalità della popolazione totale.

MODEL:	INITIAL CONDITIONS:
Cell Types:	Cell Types:
cell Line = hMSC	1 = 0
1 = Dead	2 = 100
2 = Stem	3 = 0
3 = Differentiated	total=5M
(a)	(b)

Figura 2.3: Cell Types nei file di configurazione.

2.3.2 Rules

Le regole di transizione specificano il comportamento delle cellule. La formulazione generale è la seguente:

$$ID_{rule} = ID_{start} \rightarrow ID_{end} (+ ID_{end2}), P$$

ID_{rule} è un numero intero che rappresenta il numero della regola, ID_{start} indica lo stato cellulare di partenza (morta, staminale o differenziata) mentre ID_{end} è lo stato a seguito della transizione. $(+ ID_{end2})$ permette di descrivere la migrazione cellulare e la replicazione. In questo caso ID_{end} indica lo stato della cella di partenza (che sarà 0 ovvero vuota in caso di migrazione) e ID_{end2} lo stato raggiunto dopo l'iterazione. P è una funzione di probabilità che permette di descrivere dinamiche complesse attraverso la combinazione delle variabili riportate in tabella 2.1, fornendo una rappresentazione più realistica del comportamento cellulare (25). Nelle regole ambientali si mantiene la stessa struttura delle regole di transizione; la funzione di probabilità in questo caso è formata dalla parola "environment" seguita da una sigla tra parentesi che identifica la variabile coinvolta (O2, Glc, YM).

Variabile	Definizione
TIME	Iterazione corrente divisa per la lunghezza totale della simulazione.
TD	Tempo di morte della cella corrente.
Glc	Livello locale di glucosio diviso la somma dei nutrienti nel terreno di coltura.
O2	Livello locale di ossigeno diviso la sua concentrazione nell'incubatore.
#C	Numero di cellule di tipo # diviso la cardinalità massima della popolazione.
AGE	Età della cellula diviso l'iterazione corrente.
TLD	Numero di iterazioni dopo l'ultima divisione della cellula diviso l'iterazione corrente.
YM	Modulo di Young locale diviso la rigidità iniziale dello scaffold.
DIFF	Probabilità che la cellula differenzi.

DE	Probabilità che la cellula muoia.
ST	Probabilità che la cellula rimanga nello stato corrente.

Tabella 2.1: Variabili impiegate nelle regole di transizione per definire la funzione di probabilità. Tabella riprodotta da (25) con aggiunte.

In figura 2.4 sono presenti le regole di transizione utilizzate nel presente lavoro di tesi.

Rules:

```

0 = 1->0, 0.38*(TIME-TD)
1 = 1->1, 1-(0.38*(TIME-TD))
2 = 1->0, environment (Glc)
3 = 1->0, environment (O2)
4 = 2->3, (0.01*(Glc+O2+AGE))*DIFF
5 = 2->1, (1*(1C+2C+3C)/(Glc+O2))*DE
6 = 2->2, 1-(((0.01*(Glc+O2+AGE))*DIFF)-((1*(1C+2C+
3C)/(Glc+O2))*DE)-(0.38*TLD/(O2+Glc))-(0.008*(O2)/((1C+2C+
3C)+YM)))*ST
7 = 2->2+2, 0.38*TLD/(O2+Glc)
8 = 2->0+2, 0.008*(O2)/((1C+2C+3C)+YM)
9 = 2->0.5*U, environment (Glc)
10 = 2->0.5*U, environment (O2)
11 = 3->1, (1*(1C+2C+3C)/(Glc+O2))*DE
12 = 3->3, 1-(((1*(1C+2C+3C)/(Glc+O2))*DE)-(0.38*TLD/(O2
+Glc))-(0.008*(O2)/((1C+2C+3C)+YM)))*ST
13 = 3->3+3, 0.38*TLD/(O2+Glc)
14 = 3->0+3, 0.008*(O2)/((1C+2C+3C)+YM)
15 = 3->U, environment (Glc)
16 = 3->U, environment (O2)
17 = 3-> 0.000003, environment (YM)

```

Figura 2.4: Regole di transizione ed ambientali nel file di configurazione.

Le regole 4, 5, 6, 11, 12, 13 fanno uso delle variabili DIFF, ST o DE per la cui spiegazione dettagliata si rimanda al prossimo paragrafo.

Le regole da 0 a 3 sono regole che hanno come stato di partenza le cellule morte. Nella regola 0 si esprime la probabilità che la cellula morta degradi ($ID_{end} = 0$); nella regola 1 si calcola la probabilità che la cellula morta rimanga nel suo stato sottraendo ad 1 (ovvero la probabilità dell'evento certo) il risultato della regola 0. Le regole 2 e 3 sono regole environment che modellano rispettivamente il consumo di glucosio (metabolismo) ed il

consumo di ossigeno della cellula. In questo caso non c'è consumo perché la cellula è morta.

Le regole da 4 a 10 si applicano alle cellule che nell'iterazione corrente sono staminali. Nella regola 4 è calcolata la probabilità che una cellula staminale differenzi. La probabilità di differenziamento è influenzata dalla disponibilità di nutrienti e di ossigeno nella cella, dall'età della cellula e dalla presenza della stimolazione meccanica (variabile DIFF). Nella regola 5 si esprime la probabilità di morte della cellula staminale che tiene conto del numero di cellule di ogni tipo presenti all'iterazione corrente, della disponibilità di ossigeno e glucosio e della compressione meccanica (variabile DE). La probabilità che la cellula staminale rimanga tale, nella regola 6, è calcolata sottraendo ad 1 tutte le altre probabilità che coinvolgono la staminale come stato di partenza. La variabile ST tiene conto della presenza di stimolazione meccanica. Le regole 7 ed 8 descrivono rispettivamente la duplicazione e la migrazione. Le regole 9 e 10 sono regole ambientali. La variabile U è utilizzata per quantificare il consumo di glucosio (43) ed ossigeno (44) per cellula per ora.

Le regole da 11 a 17 riguardano le cellule differenziate. La regola 11 calcola la probabilità che una cellula differenziata muoia; questo valore dipende dal numero di cellule per ogni tipo cellulare, dalla disponibilità dei nutrienti e dalla presenza della compressione meccanica (variabile DE). La probabilità che una cellula differenziata rimanga nello stesso stato è calcolata sottraendo ad 1 tutte le probabilità che coinvolgono la cellula differenziata come ID_{start} . La variabile ST tiene conto della stimolazione. Le regole 13 e 14 riguardano la duplicazione e la migrazione mentre la 15 e la 16 sono regole ambientali. L'ultima regola, la 16, tiene conto del cambiamento della rigidità dello scaffold indotto dalle cellule.

2.3.2.1 Introduzione della compressione meccanica nelle regole

Il comportamento atteso delle cellule staminali sottoposte a compressione meccanica è descritto nel grafico qualitativo in figura 2.5.

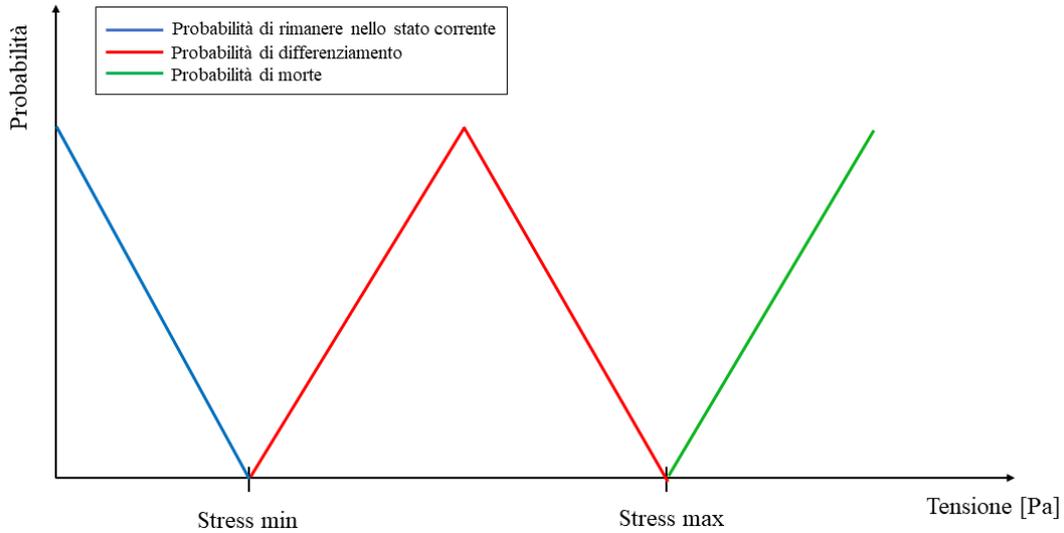


Figura 2.5: Probabilità delle cellule di rimanere nello stato corrente (linea blu), di differenziare (linea rossa), di morire (linea verde).

Si possono individuare tre regioni all'interno del grafico originate a partire dai valori di stress min e stress max. Questi sono i limiti dell'intervallo di tensione all'interno del quale le staminali differenziano in tessuto osseo (45). Tali valori sono ricavati empiricamente. Se la tensione indotta dal processo di compressione è inferiore al limite minimo, le staminali rimangono nel loro stato. Viceversa, se la tensione è eccessiva e supera il valore di stress max, le staminali vanno incontro alla morte. L'andamento di tali processi è influenzato dalla prossimità ai valori limite. In particolare, la probabilità che una cellula staminale rimanga nel proprio stato (linea blu) diminuisce avvicinandosi a stress min. La probabilità che una staminale differenzi (linea rossa) segue una distribuzione triangolare: è massima nei valori centrali dell'intervallo. Infine, la probabilità che la staminale muoia (linea verde) aumenta con la distanza da stress max.

Per riprodurre questi andamenti all'interno della simulazione, abbiamo scelto di utilizzare le tre variabili ST, DIFF e DE ed inserirle nelle regole di transizione.

Le variabili ST e DE sono utilizzate per modellare il comportamento delle cellule differenziate in risposta a valori di pressione esterni al range stress min-stress max. In particolare: la probabilità che le cellule rimangano nel proprio stato diminuisce per valori di tensione crescenti verso stress min mentre la probabilità che muoiano aumenta per valori di tensione crescenti a partire da stress max.

Le variabili ST, DIFF e DE sono pari a 1 quando la compressione meccanica è assente oppure quando la tensione totale applicata non appartiene al range di tensione in cui sono definite. In particolare:

- ST è calcolata con la seguente equazione solo se la tensione totale (stress tot) applicata allo scaffold è inferiore a stress min (altrimenti è posta uguale a 1):

$$ST = \frac{\text{stress min} - \text{stress tot}}{\text{stress min}}$$

- DIFF è calcolata solo se la tensione totale rientra nel range compreso tra stress min e stress max. Presenta l'andamento della distribuzione triangolare ed è calcolata come segue:

$$\text{media} = \frac{\text{stress min} + \text{stress max}}{2}$$

$$\left\{ \begin{array}{l} \text{DIFF} = \frac{2}{\text{stress max} - \text{stress min}} \frac{\text{stress tot} - \text{stress min}}{\text{media} - \text{stress min}} \quad (a) \\ \text{DIFF} = \frac{2}{\text{stress max} - \text{stress min}} \quad (b) \\ \text{DIFF} = \frac{2}{\text{stress max} - \text{stress min}} \frac{\text{stress max} - \text{stress tot}}{\text{stress max} - \text{media}} \quad (c) \end{array} \right.$$

(a) $\text{stress min} \leq \text{sigma tot} < \text{media}$

(b) $\text{sigma tot} = \text{media}$

(c) $\text{media} \leq \text{sigma tot} < \text{stress max}$

- DE è calcolata con la seguente equazione solo se la tensione totale è superiore a stress max (altrimenti è posta uguale a 1):

$$ST = \frac{\text{stress tot} - \text{stress max}}{\text{stress max}}$$

2.3.3 Scaffold

La sezione “Scaffold” del file di configurazione ne descrive la geometria, il materiale e la porosità.

Lo scaffold di alginato è modellato come un cubo, di lato 1 cm, costituito da 10 strati che ne vanno a definire la griglia di celle e quindi la risoluzione nell'approssimazione ad automa cellulare (1 mm). In questa sezione sono anche riportate le caratteristiche meccaniche dell'alginato e in particolare il suo modulo di Young.

2.3.3.1 Modulo di Young scaffold di alginato

Il modulo di Young è una grandezza meccanica che fornisce indicazioni sulla rigidità del materiale. È definito come il rapporto tra tensione applicata e conseguente deformazione in un materiale elastico in regime di sollecitazione monoassiale. All'aumentare del modulo di Young aumenta la rigidità del materiale e quindi la resistenza alla deformazione.

Il modulo di Young iniziale dello scaffold di alginato è posto pari a 10 kPa ed è stato ricavato da (46). Nel corso della simulazione il valore del modulo di Young varia, tramite l'applicazione delle regole environment perché è stato dimostrato (47) che l'interazione tra cellule e matrice extracellulare tende ad irrigidire quest'ultima.

Nell'implementazione si terrà conto di questa importante variabilità: ad ogni iterazione, il modulo di Young viene aggiornato con il valore corrente portando alla modifica dei valori di tensione, spostamento e deformazione.

Ulteriori proprietà dello scaffold di alginato necessarie per i nostri scopi sono state introdotte nella sezione “Stress” descritta di seguito.

2.3.4 Stress

La nuova sezione “Stress” introdotta nel file di configurazione si presenta come in figura 2.6 e raccoglie le variabili necessarie all'applicazione della teoria dell'elasticità lineare per il calcolo della distribuzione di tensione sullo scaffold.

Stress:

```
strain [%] = 1  
density [g/cm3] = 1.03  
Poisson ratio [-] = 0.35  
min stress [Pa] = 50  
max stress [Pa] = 160  
frequency [Hz] = 0.5
```

Figura 2.6: Sezione Stress nel file di configurazione.

Lo scaffold di alginato è sottoposto ad una deformazione ciclica longitudinale dell'1% (strain in figura 2.6). Questa quantità è fornita direttamente dal bioreattore che attua il processo di compressione ed è un valore di riferimento utilizzato in molti studi che vertono su questo tema (39; 40).

Gli estremi del range di tensione che garantisce il differenziamento (min stress e max stress in figura 2.6) sono stati descritti nel paragrafo 2.3.2.1.

La frequenza di stimolazione (frequency in figura 2.6) è variabile (0.5, 1 o 2 Hz) e sarà discussa nel dettaglio nel paragrafo 2.4.

2.3.4.1 Densità scaffold di alginato

La densità dello scaffold varia a seconda della concentrazione percentuale di alginato utilizzata. La tabella presente in (48) fornisce i valori di densità corrispondenti a concentrazioni percentuali in scaffold di alginato dall'1.5% fino a 3.5%. Questi valori sono stati interpolati per ricavare la densità degli scaffold prodotti nel Laboratorio di Ingegneria Cellulare e Molecolare "S. Cavalcanti", che utilizzano una percentuale di alginato pari all'1%.

2.3.4.2 Coefficiente di Poisson scaffold di alginato

Il coefficiente di Poisson è una costante adimensionale positiva, specifica per ogni materiale, data dal rapporto tra la deformazione trasversale e quella longitudinale in regime di sollecitazione monoassiale.

Il coefficiente di Poisson utilizzato nel presente lavoro di tesi è preso da un articolo in letteratura (49) in cui viene calcolato sperimentalmente per differenti valori di concentrazione.

In tabella 2.2 si riporta un elenco delle principali proprietà dello scaffold di alginato e dei rispettivi valori utilizzati nella modellazione.

Proprietà	Valore	Unità di misura
E (modulo di Young) iniziale	10000	[Pa]
ρ (densità)	1.03	[g/cm ³]
ν (coefficiente di Poisson)	0.35	[-]

Tabella 2.2: Proprietà dello scaffold di alginato.

2.4 Protocolli di stimolazione

Il tessuto osseo è sottoposto continuamente a stimolazioni meccaniche che ne favoriscono il processo differenziativo.

In questa tesi si analizzano, *in silico*, 10 protocolli di stimolazione differenti per poter individuare le condizioni migliori per indurre il differenziamento in fenotipo osseo delle cellule staminali seminate su uno scaffold di alginato sottoposto a compressioni cicliche. Tutte le condizioni analizzate sono replicabili *in vitro*, mediante l'ausilio di un bioreattore a compressione. I protocolli di stimolazione che mostrano risultati promettenti possono essere utilizzati in laboratorio come protocolli sperimentali.

Si è scelto di comprimere ciclicamente lo scaffold con tre differenti frequenze (0.5, 1 e 2 Hz) riportate in numerosi studi in letteratura (40; 33; 39). In particolare, si è deciso di stimolare quotidianamente o a giorni alterni, una o due volte al giorno, in monofrequenza oppure con frequenze variabili. Ogni stimolazione ha la durata di 60 minuti e il protocollo si completa in 10 giorni. La stimolazione è fatta partire dal giorno 2 (ad eccezione delle condizioni 9 e 10) per simulare un iniziale periodo di assestamento del sistema. Per ogni condizione sono state eseguite 25 simulazioni.

In tabella 2.3 i dettagli per ogni prova eseguita.

Condizione	Stimolazione	Distanza tra le stimolazioni giornaliere [ore]	Frequenza [Hz]	Numero simulazioni eseguite
1	Singola, Giornaliera	-	0.5	25
2	Doppia, Giorni alterni	7	2	25
3	Doppia, Giornaliera	2	0.5	25
4	Doppia, Giornaliera	2	1.0	25
5	Doppia, Giornaliera	2	2.0	25
6	Doppia, Giornaliera	7	0.5	25
7	Doppia, Giornaliera	7	1.0	25
8	Doppia, Giornaliera	7	2.0	25
9	Doppia, Giornaliera	7	0.5 (giorni 1-3) 1 (giorni 4-10)	25
10	Doppia, Giornaliera	7	0.5 (giorni 1-3) 1 (giorni 4-8) 2 (giorni 9-10)	25

Tabella 2.3: Protocolli di stimolazione (condizioni) analizzate.

Si rimanda al capitolo 3 per un'analisi approfondita dei risultati delle simulazioni.

2.5 File di output Stress

Come discusso in precedenza, al termine della simulazione, SALSA crea file di output distinti per ognuna delle grandezze di interesse; tra di esse abbiamo introdotto anche la distribuzione di tensione. Nel file di output "Stress" (figura 2.7) i risultati ottenuti sono divisi in base all'iterazione a cui corrispondono (keyword "Time"). In ogni sezione si distinguono 4 colonne: nella prima chiamata "t" è rappresentato il tempo e nelle restanti colonne la tensione lungo le direzioni X, Y, Z in Pascal.

Al variare della frequenza di stimolazione varia il numero di compressioni attuate in un'ora. A 0.5 Hz, per garantire un impulso ogni 2 secondi, l'iterazione è suddivisa in 3600 valori. Ad 1 Hz, (un impulso ogni secondo), avremo 7200 valori mentre a 2 Hz (un impulso ogni mezzo secondo) 14.400 valori.

```
Time: 27
t      X_stress  Y_stress  Z_stress
0      37.970747141  37.970747141  -73.4204770013
1      0.0  0.0  0.0
2      37.970747141  37.970747141  -73.4204770013
3      0.0  0.0  0.0
4      37.970747141  37.970747141  -73.4204770013
5      0.0  0.0  0.0
6      37.970747141  37.970747141  -73.4204770013
7      0.0  0.0  0.0
8      37.970747141  37.970747141  -73.4204770013
9      0.0  0.0  0.0
10     37.970747141  37.970747141  -73.4204770013
11     0.0  0.0  0.0
12     37.970747141  37.970747141  -73.4204770013
13     0.0  0.0  0.0
14     37.970747141  37.970747141  -73.4204770013
15     0.0  0.0  0.0
16     37.970747141  37.970747141  -73.4204770013
17     0.0  0.0  0.0
18     37.970747141  37.970747141  -73.4204770013
19     0.0  0.0  0.0
20     37.970747141  37.970747141  -73.4204770013
21     0.0  0.0  0.0
22     37.970747141  37.970747141  -73.4204770013
23     0.0  0.0  0.0
24     37.970747141  37.970747141  -73.4204770013
```

Figura 2.7: Porzione del file di output "Stress".

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

Per individuare il protocollo ottimale da applicare *in vitro* per indurre osteogenesi in scaffold di alginato con a bordo cellule staminali abbiamo considerato 10 condizioni differenti (e 25 simulazioni per ognuna di esse), come illustrato in tabella 2.7. Al termine di ogni simulazione abbiamo valutato gli effetti della compressione analizzando il file di output “Cell” in cui è salvato, per ogni iterazione e per ogni cella dello scaffold, lo stato cellulare corrispondente (cellula morta, staminale o differenziata). In particolare, per ogni condizione, abbiamo concentrato la nostra attenzione sul numero medio di cellule staminali e di cellule differenziate presenti per ogni interazione e sulla relativa deviazione standard. Il numero di cellule morte è risultato essere trascurabile per tutte le simulazioni. La popolazione iniziale per ogni condizione, è composta da un totale di 5 milioni di cellule, tutte staminali.

3.1 Analisi delle 10 condizioni

Riportiamo di seguito, per ogni condizione, un grafico con l’andamento medio del numero di cellule staminali e differenziate durante i 10 giorni di simulazione (240 iterazioni).

3.1.1 Condizione 1

La condizione 1 è caratterizzata da una singola stimolazione quotidiana, a partire dal giorno 2 (in particolare dall’iterazione 27) fino al termine della prova. I risultati di questa prova sono riportati in figura 3.1 come media e deviazione standard delle 25 simulazioni effettuate.

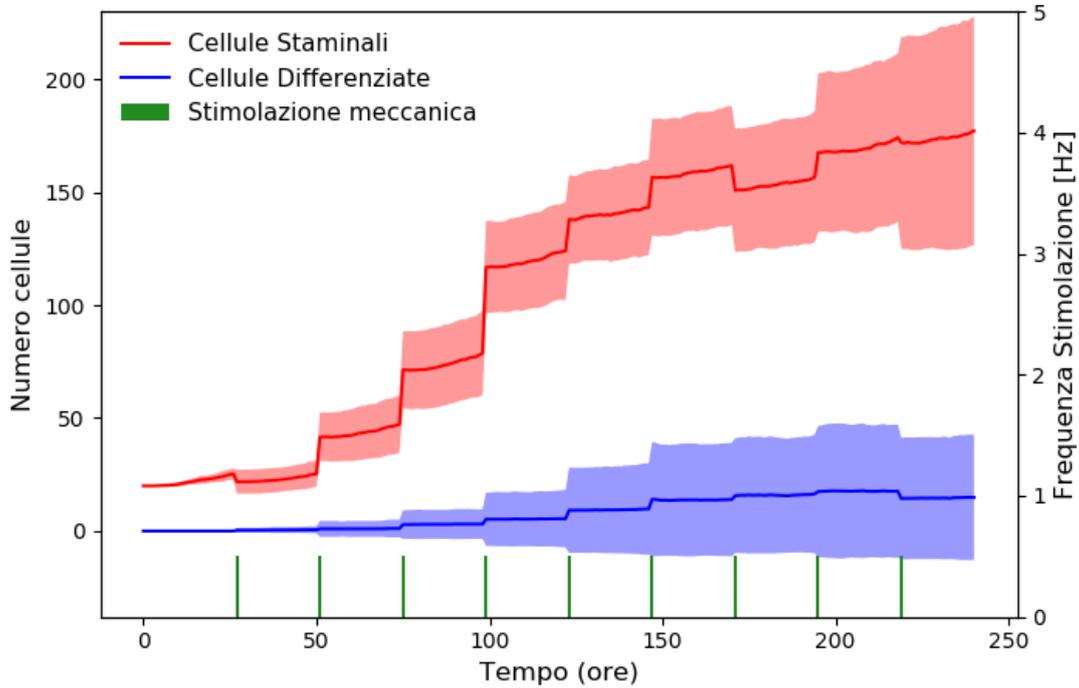


Figura 3.1: Condizione 1.

L'asse delle ascisse scandisce la durata della simulazione, espressa in ore. Le barrette verdi indicano l'iterazione nella quale si avvia la compressione ciclica dello scaffold, della durata di un'ora. L'asse delle ordinate di destra indica la frequenza alla quale la sollecitazione è applicata, in questo caso 0.5 Hz. L'asse delle ordinate di sinistra, invece, indica il numero di cellule, staminali (in rosso) e differenziate (in blu). In entrambi i casi la linea continua rappresenta la media e l'area ombreggiata la deviazione standard.

In questa condizione assistiamo ad un progressivo aumento del numero medio di cellule staminali, che si protrae fino alla fine della simulazione. In particolare, si notano picchi di crescita in corrispondenza della stimolazione meccanica ed un andamento generale di lieve crescita nell'intervallo tra due compressioni successive. Si deduce quindi che la sollecitazione meccanica favorisce il processo proliferativo delle staminali. Questo è un comportamento emergente, di grande interesse, in quanto la regola di transizione che descrive la proliferazione delle cellule staminali non dipende dalla compressione ma, come descritto in (50), stimoli meccanici a bassa frequenza possono indurre proliferazione cellulare. La duplicazione delle staminali, pur sottraendo risorse al loro differenziamento, è un processo utile al mantenimento della popolazione e quindi all'ottenimento di una popolazione più numerosa.

Per quanto riguarda le cellule differenziate, si assiste ad una progressiva crescita, a partire dalla cinquantesima iterazione, sempre in corrispondenza della stimolazione meccanica. Il numero di cellule al termine della simulazione rimane però molto limitato e ci porta a concludere che la stimolazione singola giornaliera non rappresenta un protocollo di stimolazione ottimale del fenotipo osseo.

3.1.2 Condizione 2

La condizione 2 consiste in una stimolazione doppia (con un intervallo di 7 ore tra la prima e la seconda compressione giornaliera) a giorni alterni a partire dall'iterazione 27. In figura 3.2 i risultati ottenuti dalle 25 simulazioni effettuate.

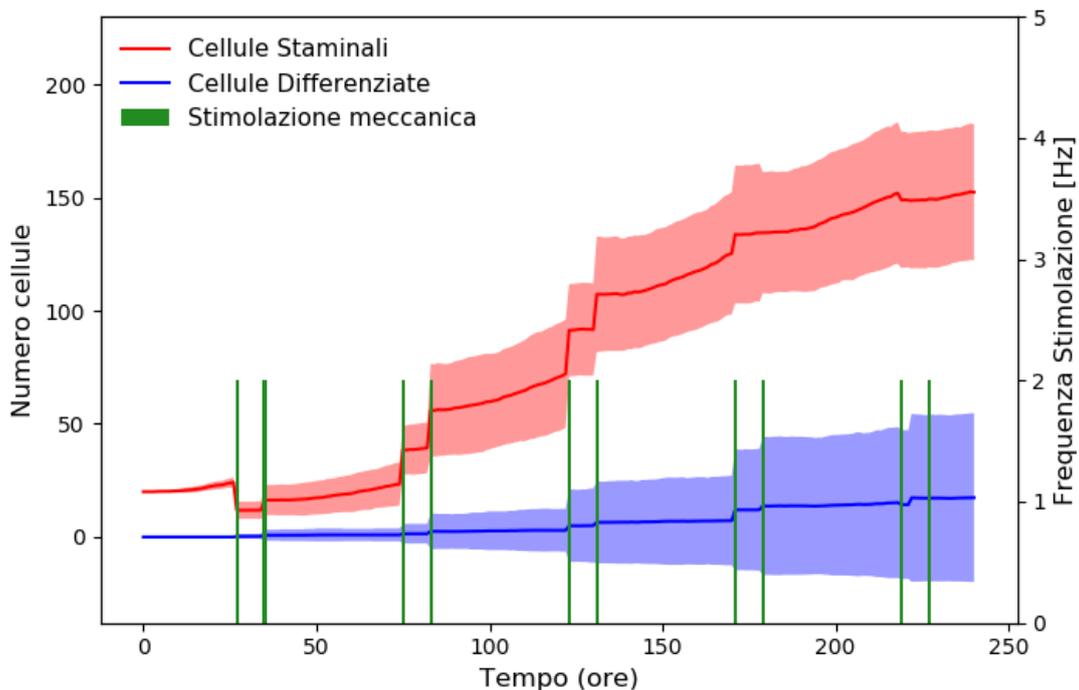


Figura 3.2: Condizione 2.

Questa condizione mostra risultati affini alla condizione precedente per entrambi i fenotipi cellulari considerati. Le cellule staminali sembrano risentire positivamente, in termini proliferativi, dell'applicazione del carico compressivo. Le cellule differenziate invece, si sviluppano in quantità molto limitata. Nelle condizioni descritte nei paragrafi

successivi si nota come una stimolazione doppia, quotidiana, comporti risultati nettamente migliori in termini di differenziamento delle cellule staminali.

3.1.3 Confronto condizioni 3, 4, 5, 6, 7, 8

In questa sezione si confrontano le condizioni caratterizzate da una doppia stimolazione giornaliera per tutta la durata della simulazione a partire dal giorno 2. (figura 3.3)

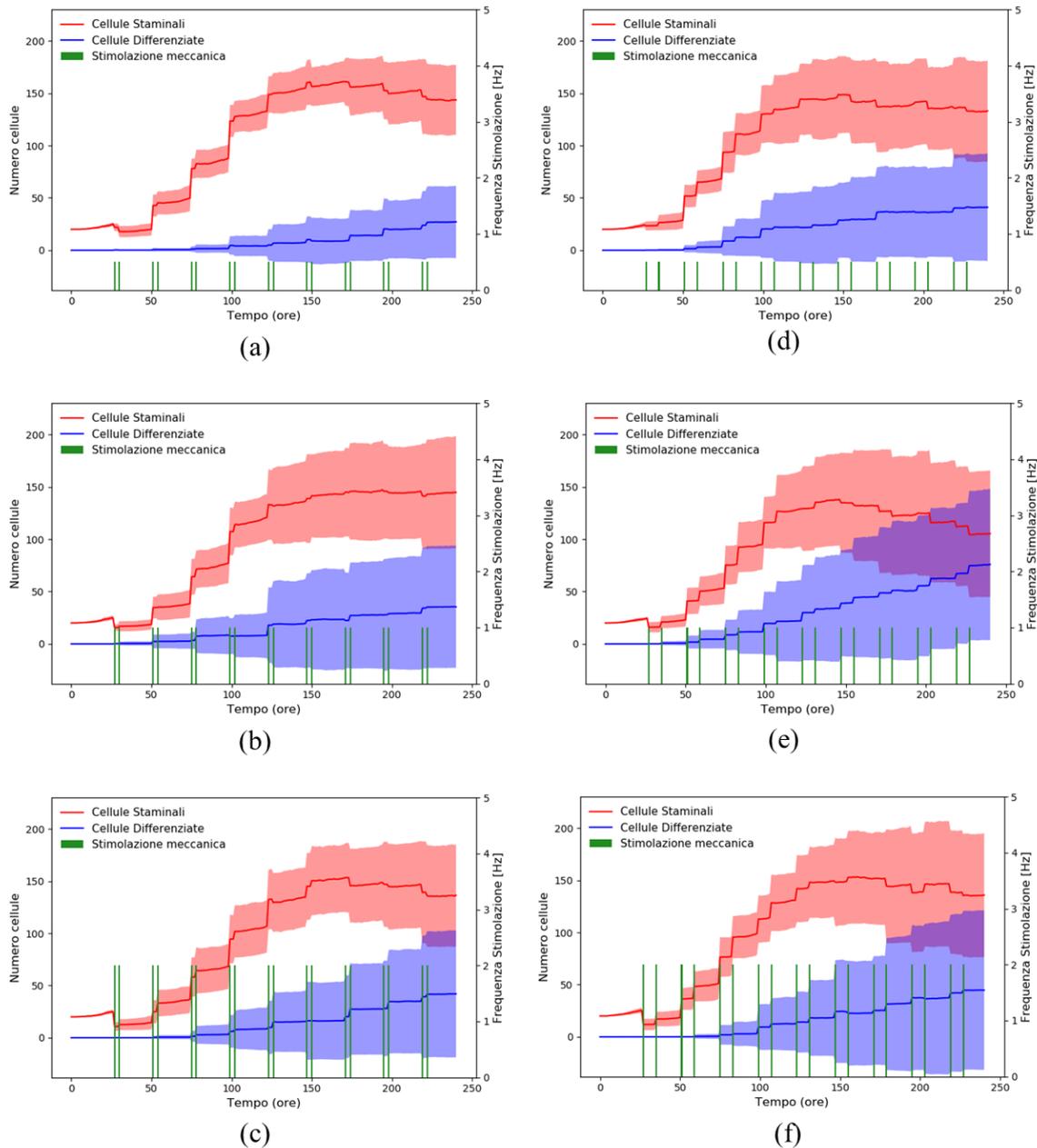


Figura 3.3: Confronto condizioni 3 (a), 4 (b), 5 (c), 6 (d), 7 (e) e 8 (f).

Nella prima colonna sono riportati i grafici corrispondenti alle condizioni 3 (a), 4 (b) e 5 (c) nelle quali la distanza tra i due cicli di stimolazione giornaliera è di 2 ore. Nella seconda colonna sono rappresentate le condizioni 6 (d), 7 (e) e 8 (f) in cui l'intervallo tra le due compressioni è di 7 ore. Nella prima riga della figura 3.3 sono riportate le condizioni a frequenza 0.5 Hz, nella seconda riga la frequenza di stimolazione è pari a 1 Hz mentre nell'ultima riga è pari a 2 Hz.

Le cellule staminali presentano un andamento crescente a partire dalla prima stimolazione (alla ventisettesima iterazione) per poi stabilizzarsi approssimativamente intorno all'iterazione 150 e poi decrescere, in alcune condizioni, nelle ultime ore di simulazione. La prima fase di crescita indica la presenza di processi di duplicazione, come nelle condizioni descritte in precedenza. Nella seconda fase di stabilizzazione i processi di duplicazione probabilmente sono equiparabili a quelli differenziativi: in questo range di iterazioni, infatti, si assiste ad una crescita consistente delle cellule differenziate.

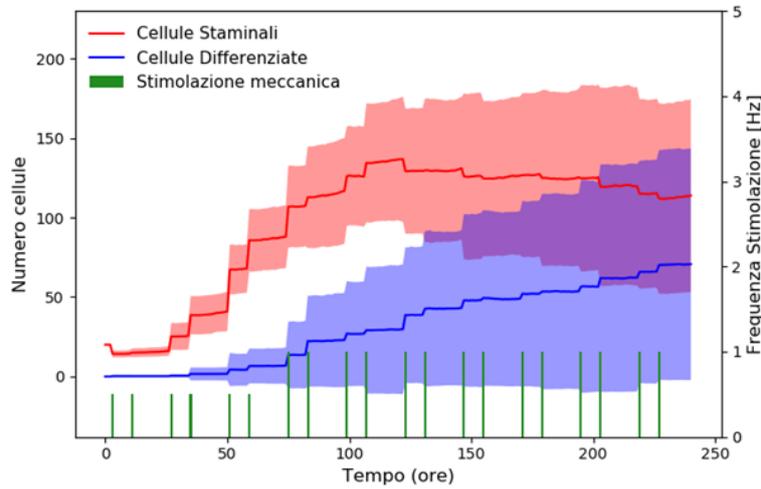
Le cellule differenziate, inizialmente assenti, cominciano a comparire a partire dall'iterazione 50 e mantengono l'andamento di crescita desiderato fino alla fine della simulazione. Il numero medio di cellule differenziate ottenute cambia a seconda delle varie condizioni (tabella 3.1). In particolare, si nota che i risultati migliori si ottengono nelle condizioni 6, 7 e 8. Il maggiore intervallo di tempo che intercorre tra la prima e la seconda stimolazione giornaliera, infatti, risulta vantaggioso per le cellule differenziate perché permette loro di proliferare con più efficacia. La distanza tra le due stimolazioni è quindi un importante parametro da considerare, sia in fase di simulazione che nei protocolli sperimentali.

La condizione migliore tra le 6 investigate in termini di numero medio di cellule differenziate alla fine della simulazione è la numero 7. Dalla figura 3.3e si può notare come questa condizione sia associata anche ad una grande variabilità. Questo aspetto verrà ulteriormente analizzato nel seguito.

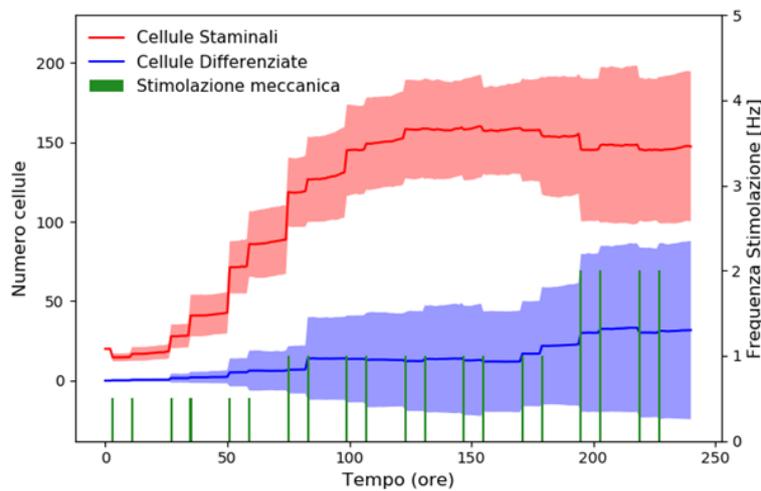
3.1.4 Condizioni 9 e 10

Nelle condizioni 9 e 10 si è scelto di utilizzare protocolli di stimolazione più complessi che impiegano 2 o 3 frequenze nel corso dell'esperimento. Si è infatti ipotizzato che un progressivo aumento di questo parametro possa portare alla produzione di un maggior numero di cellule differenziate. Nella condizione 9 (figura 3.4.a), fino al giorno 3, la

frequenza è di 0.5 Hz e sale a 1 Hz nei restanti giorni della simulazione. Nella condizione 10 (figura 3.4.b), invece, si utilizzano tre frequenze: 0.5 Hz per i primi tre giorni, 1 Hz dal giorno 4 al giorno 8 mentre 2 Hz negli ultimi 2 giorni.



(a)



(b)

Figura 3.4: Condizione 9 (a) e 10 (b).

La condizione 9, risulta associata ad una popolazione di cellule differenziate più numerosa, rispetto alla condizione 10 ed ha risultati analoghi alla condizione 7. Se ne deduce quindi che non necessariamente aumentare la complessità del protocollo porta benefici maggiori.

3.1.5 Condizioni migliori

In tabella 3.1 sono riportati il numero medio e la deviazione standard delle cellule staminali e delle cellule differenziate in proporzione alla popolazione cellulare totale della condizione considerata.

Condizione	Cellule Staminali Normalizzate	Cellule Differenziate Normalizzate
1	0.92 ± 0.46	0.08 ± 0.15
2	0.90 ± 0.40	0.10 ± 0.22
3	0.84 ± 0.38	0.16 ± 0.21
4	0.80 ± 0.60	0.19 ± 0.34
5	0.76 ± 0.55	0.24 ± 0.37
6	0.76 ± 0.52	0.24 ± 0.32
7	0.58 ± 0.54	0.42 ± 0.5
8	0.75 ± 0.66	0.25 ± 0.46
9	0.61 ± 0.55	0.38 ± 0.48
10	0.82 ± 0.54	0.18 ± 0.33

Tabella 3.1: Numero medio e deviazione standard delle cellule staminali e delle cellule differenziate in proporzione alla popolazione cellulare totale della condizione considerata.

Questo dato, rappresentato anche in figura 3.5, dimostra chiaramente che le condizioni in cui si sviluppano un maggior numero di cellule differenziate sono quelle a stimolazione quotidiana doppia ad 1 Hz per almeno il 70% della simulazione (condizioni 7 e 9). Nel paragrafo successivo questi protocolli sono stati ulteriormente analizzati.

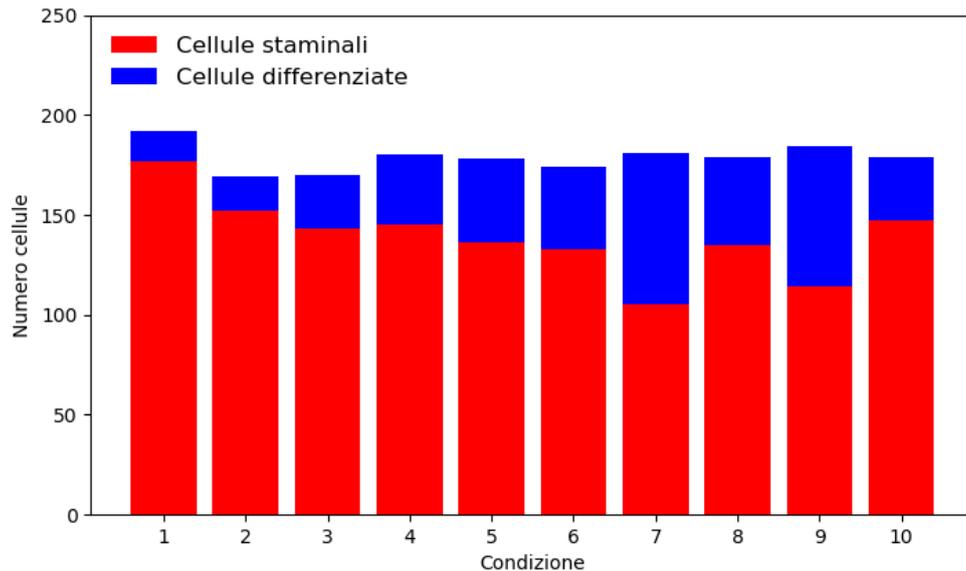


Figura 3.5: Numero medio di cellule staminali (in rosso) e differenziate (in blu) per ognuna delle 10 condizioni.

3.2 Analisi comparata condizioni migliori

Per poter studiare nel dettaglio la condizione 7 e la numero 9 abbiamo analizzato singolarmente le 25 simulazioni realizzate per ciascuna condizione e riprodotto, per ciascuna delle 50 simulazioni, il grafico con l'andamento nel tempo del numero delle cellule staminali e delle differenziate. Una visione d'insieme di questi grafici è riportata in figura 3.6 e in figura 3.7 per le condizioni 7 e 9 rispettivamente. Osservando qualitativamente i risultati ottenuti, si può notare, in entrambe le condizioni, la presenza di 3 diverse classi di comportamento delle cellule differenziate.

- Gruppo 1 (condizione peggiore): il numero di cellule differenziate è prossimo allo zero per tutta la durata della simulazione oppure si discosta dallo zero per brevi tratti ma, al termine della simulazione, è nullo (grafici racchiusi da un contorno giallo nelle figure 3.6 e 3.7 ed esempio rappresentativo in figura 3.8a).
- Gruppo 2 (condizione intermedia): le cellule differenziate cominciano a crescere nella parte intermedia o finale della simulazione (contorno celeste nelle figure 3.6 e 3.7 ed esempio rappresentativo in figura 3.8b).
- Gruppo 3 (condizione migliore): le cellule differenziate cominciano ad aumentare già nelle prime fasi della simulazione e al termine sono in numero pari o superiore alle staminali (contorno fucsia ed esempio rappresentativo in figura 3.8c).

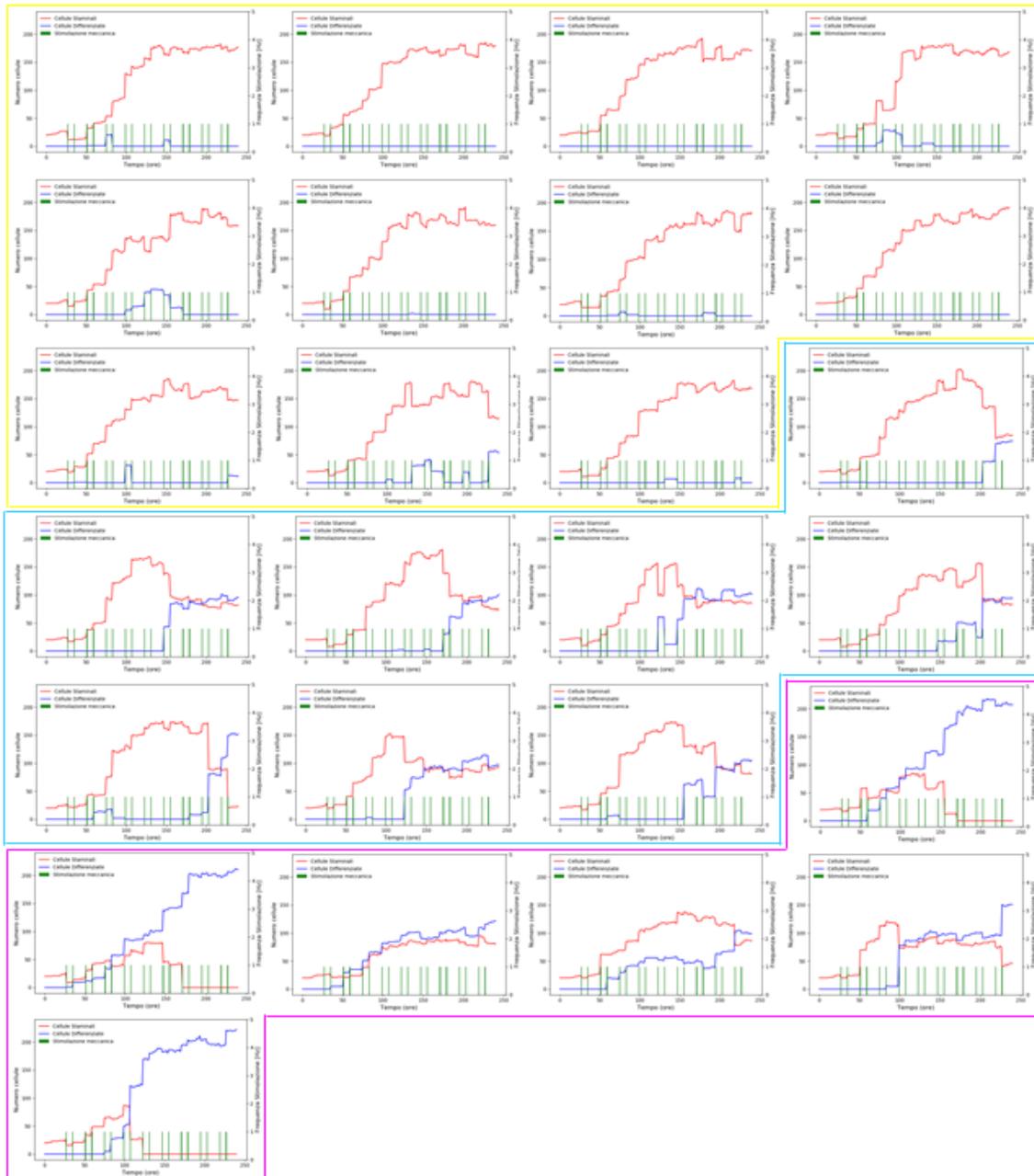


Figura 3.6: Le 25 simulazioni della condizione 7 suddivise per gruppi di appartenenza. In giallo il gruppo 1, in celeste il gruppo 2 e in fucsia il gruppo 3.

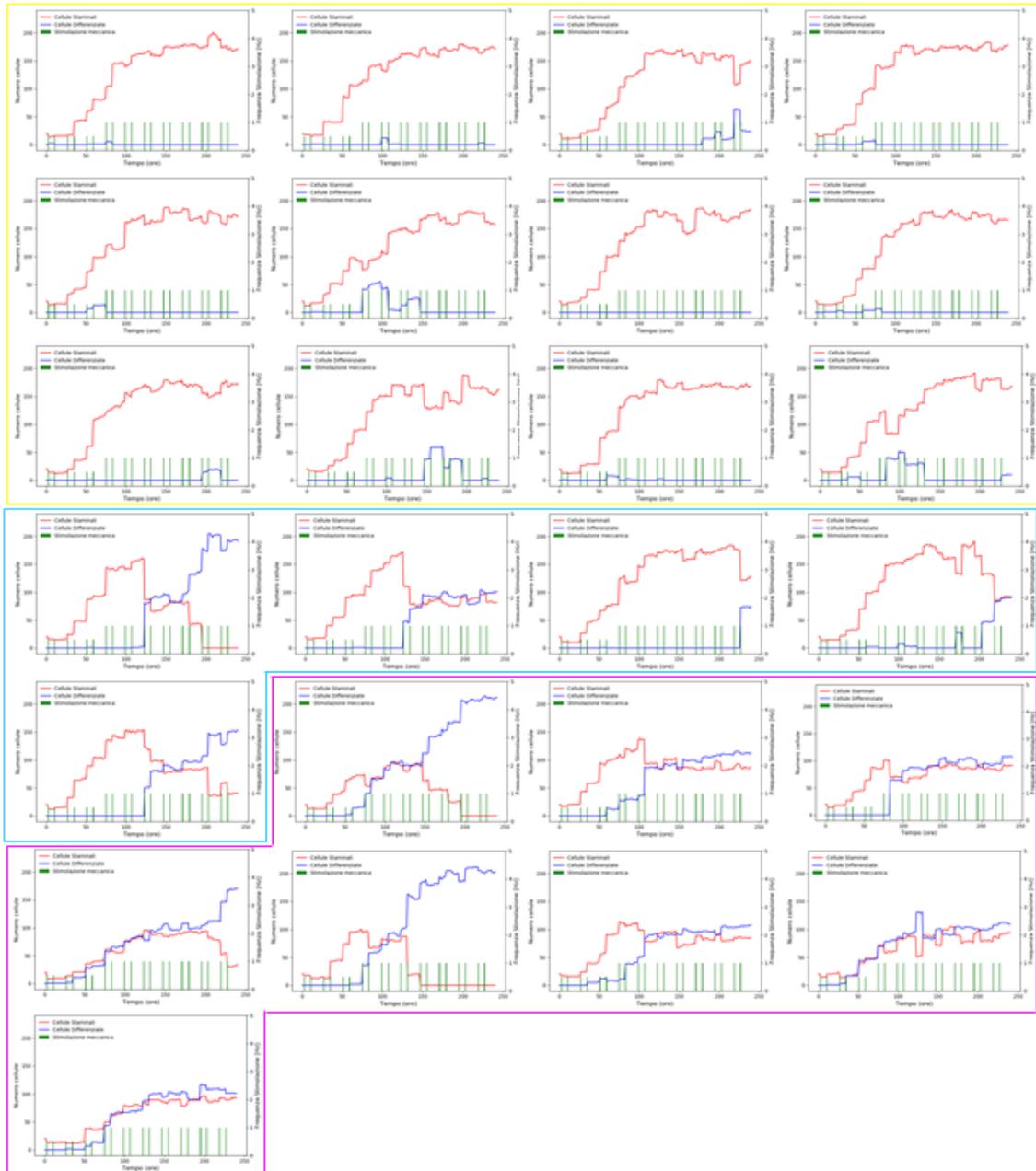


Figura 3.7: Le 25 simulazioni della condizione 9 suddivise per gruppi di appartenenza. In giallo il gruppo 1, in celeste il gruppo 2 e in fucsia il gruppo 3.

La prevalenza di questi comportamenti, riportata in tabella 3.2, risulta dipendente dalla condizione, come evidenziato nell'ultima colonna (Delta).

Gruppo	Condizione 7	Condizione 9	Delta
1	(11/25) 44%	(12/25) 48%	+4%
2	(8/25) 32%	(5/25) 20%	-12%
3	(6/25) 24%	(8/25) 32%	+8%

Tabella 3.2: Numero di simulazioni e relative percentuali per ogni gruppo nelle 2 condizioni analizzate.

Circa il 50% delle simulazioni appartiene al gruppo 1 in entrambe le condizioni. Questo dato risulta coerente con la realtà sperimentale nella quale la resa dei protocolli di differenziamento risulta generalmente piuttosto bassa (51).

Nella condizione 9 si osserva una maggiore prevalenza di simulazioni nel gruppo 3 a discapito del gruppo 2. Questo è un dato significativo che ci induce ad ipotizzare che la stimolazione multifrequenza potrebbe essere una condizione migliore rispetto alla stimolazione monofrequenza in quanto aumenta la percentuale di esperimenti con esiti desiderati.

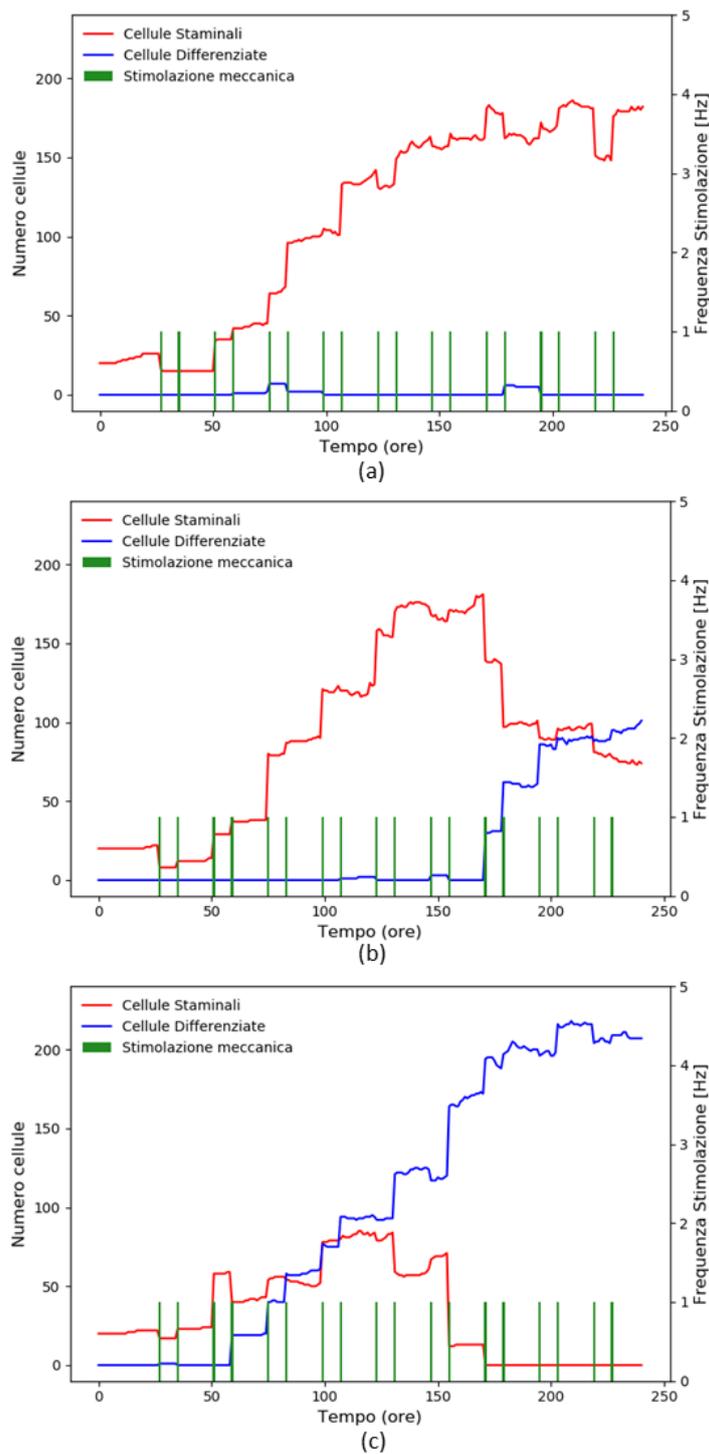


Figura 3.8: Esempi di grafici di simulazioni appartenenti al gruppo 1 (a), gruppo 2 (b) e gruppo 3 (c).

L'effettiva presenza dei tre gruppi appena descritti è confermata dalla diminuzione, in figura 3.9, della variabilità osservata in precedenza. In questo caso, infatti, solo simulazioni omogenee sono state mediate.

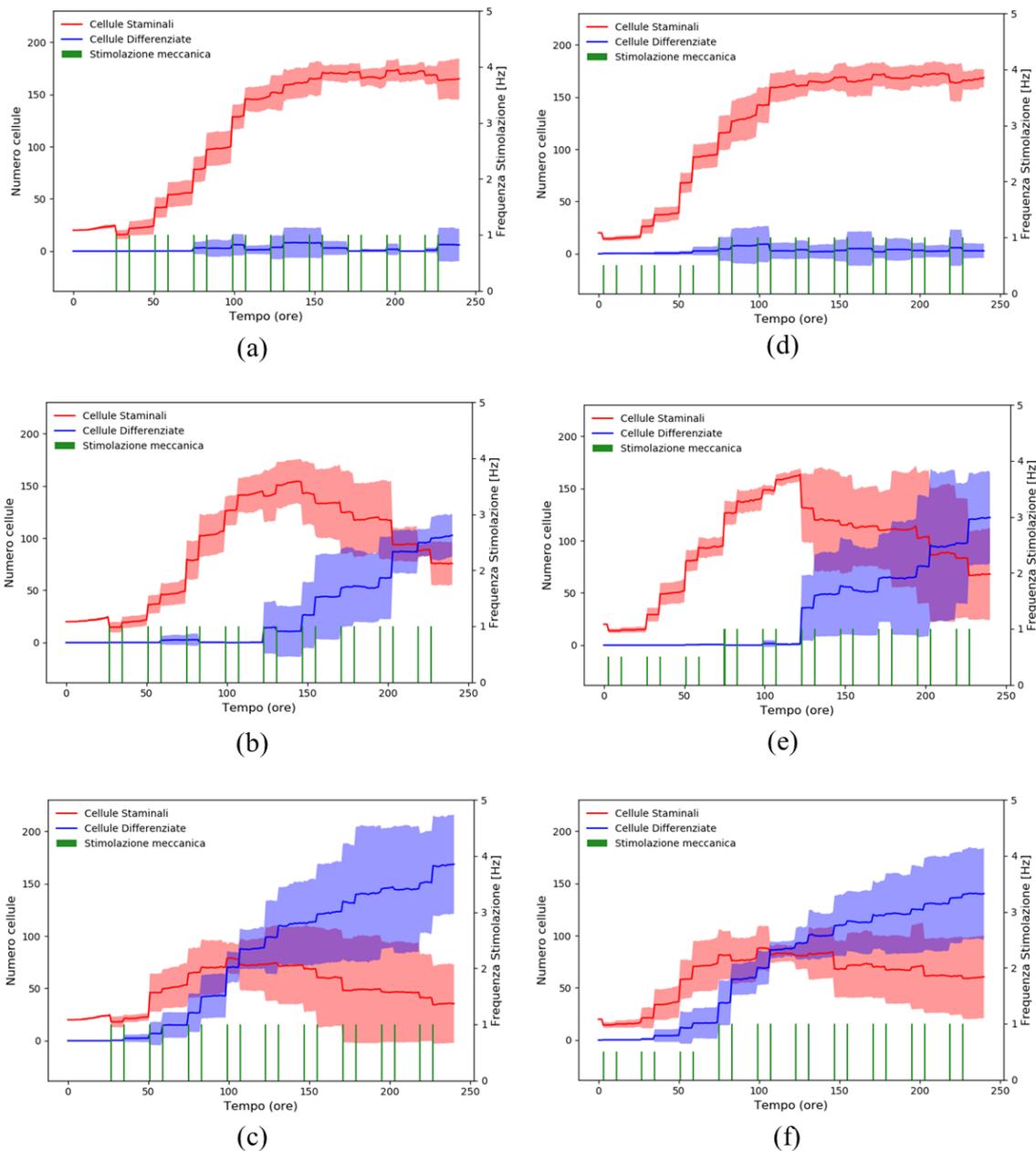


Figura 3.9: Media e deviazione standard delle cellule staminali e differenziate nella condizione 7 (prima colonna) e nella condizione 9 (seconda colonna) per ciascun gruppo: gruppo 1 (figura a e figura d), gruppo 2 (figura b e figura e), gruppo 3 (figura c e figura f).

La grande variabilità riscontrata quando si considera la totalità delle simulazioni per ogni condizione, si spiega quindi con la presenza di questi andamenti molto differenti tra le singole simulazioni. Nel seguito un'analisi di diverse condizioni che possono influenzare questo aspetto.

- Numero cellule differenziate che compaiono alla prima stimolazione

Come si può notare nei grafici e nella tabella seguente, per la condizione 7, nel gruppo 1, alla prima stimolazione, le cellule differenziate risultano assenti; nel gruppo 2 e nel 3 invece cominciano a comparire. Questo potrebbe significare che i risultati migliori in termini di cellule differenziate totali si ottengono quando già a partire dalla prima stimolazione vengono prodotte. Se questo non si verifica, come nel gruppo 1, la probabilità che non si sviluppino è molto alta.

Questo ragionamento però non può essere applicato alla condizione 9 in cui il maggior sviluppo di cellule differenziate finali non sembra connesso a quelle prodotte a partire dalla prima iterazione.

Condizione	Gruppo	Media Cellule differenziate prima stimolazione	Media Cellule differenziate finali
7	1	0.0 ± 0.0	6.0 ± 15.6
	2	0.125 ± 0.33	102.625 ± 20.5
	3	0.33 ± 0.5	168.5 ± 47.2
9	1	0.33 ± 0.6	2.8 ± 6.9
	2	0 ± 0	122 ± 43.3
	3	0.25 ± 0.4	140 ± 44

Tabella 3.3: Numero medio e deviazione standard delle differenziate presenti in ogni gruppo, per la condizione 7 e per la condizione 9, alla prima stimolazione e al termine della simulazione.

- Densità popolazione

Calcolando la densità di popolazione totale reale presente alla prima stimolazione si nota che (tabella 3.4), per quanto riguarda la condizione 7, una maggiore densità di popolazione risulta associata ad un più alto numero di cellule differenziate prodotte alla

fine della simulazione. Infatti, mentre nei gruppi 1 e 2 la popolazione totale è all'incirca simile, nel gruppo 1 risulta molto maggiore (4,6 milioni).

Nella condizione 9 invece la densità cellulare risulta simile in tutti e tre i gruppi.

Condizione	Gruppo	Densità cellulare reale prima stimolazione (milioni di cellule)
7	1	3.95
	2	3.68
	3	4.58
9	1	3.65
	2	3.45
	3	3.66

Tabella 3.4: Densità cellulare reale per gruppo, per la condizione 7 e la condizione 9.

- Rateo di crescita cellule staminali

Analizzando il rateo di crescita delle cellule staminali nel range di iterazioni 50-100, si nota (tabella 3.5) che in entrambe le condizioni, la pendenza della curva del gruppo 3 è circa la metà di quella negli altri gruppi. Questo ci fa ipotizzare che una maggiore tendenza alla proliferazione limiti il differenziamento e quindi il successo dell'esperimento.

Condizione	Gruppo	Rateo di crescita cellule staminali iterazioni 50-100 [cellule/h]
7	1	2.1
	2	2.1
	3	1.1
9	1	2.0
	2	1.9
	3	1.0

Tabella 3.5: Rateo di crescita cellule staminali per gruppo, per la condizione 7 e per la condizione 9. Il rateo di crescita non è riferito alla singola cellula ma alla popolazione e corrisponde al numero di cellule che duplicano nell'unità di tempo.

- Osservazione qualitativa grafici figura 3.9

In entrambe le condizioni, nel gruppo 2, la curva che descrive il numero medio di cellule differenziate sembra avere un andamento simile alla curva nel gruppo 3 ma ritardato nel tempo. Questo ci porta ad ipotizzare che, un tempo di simulazione superiore ai 10 giorni, per le prove del gruppo 2, potrebbe portare risultati affini a quelli del gruppo 3 in termini di cellule differenziate ottenute.

- Distribuzione cellule nel volume dello scaffold

Abbiamo analizzato il numero di cellule presenti, in ogni gruppo, in seguito alla prima iterazione, nello strato esterno, medio ed interno dello scaffold. Sia per quanto riguarda la condizione 7 che per la 9, la distribuzione delle cellule non influisce sulla variabilità delle simulazioni ottenute. In tutti i gruppi si nota una migrazione delle cellule verso lo strato esterno dello scaffold in cui possono la concentrazione di ossigeno e nutrienti è maggiore.

4. CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI

Avvalersi di strumenti computazionali (come SALSA), in ambito biologico, permette di elaborare una casistica molto superiore rispetto a quella effettivamente realizzabile in laboratorio e di analizzare nel dettaglio le simulazioni effettuate per poter selezionare e poi riprodurre *in vitro* solo quelle che mostrano risultati soddisfacenti.

La compressione ciclica, *in silico*, dello scaffold di alginato con a bordo le cellule staminali mostra risultati soddisfacenti, in termini di induzione del fenotipo osseo. Si sono analizzati differenti condizioni di stimolazione, a parità di deformazione applicata (1%), e gli esiti più promettenti si sono ottenuti con cicli doppi di stimolazione applicati quotidianamente. Una stimolazione applicata con costanza durante tutta la prova sembra favorire il differenziamento cellulare rispetto a condizioni nelle quali la stimolazione è ridotta in termini di cicli giornalieri. Le prove che mostrano i risultati più interessanti sono due: la condizione in cui si stimola ad una frequenza di 1 Hz e quella in cui si usano due frequenze di stimolazione diverse nel corso della simulazione. Questi sono risultati promettenti, che potrebbero essere utilizzati come protocolli sperimentali, attraverso l'ausilio di bioreattori a compressione.

L'analisi computazionale potrebbe poi essere ulteriormente sviluppata per comprendere diversi aspetti tra cui:

- Confronto con l'analisi sperimentale per ottimizzare e validare i risultati ottenuti *in silico*.
- Estendere a oltre 10 giorni la durata delle simulazioni per osservare se, il comportamento dei gruppi 1 ed in particolare 2, ritardato nel tempo, risulti simile a quello del gruppo 3 in termini di cellule differenziate prodotte.
- Analisi più approfondita dei fattori che possono influenzare la variabilità delle simulazioni associate ad ogni condizione.
- Individuazione dei possibili fattori su cui agire *in silico* ed *in vitro* per avere una prevalenza di simulazioni associabili al gruppo 3.
- Considerare lo scaffold di alginato un mezzo anisotropo. Il modello isotropo, utilizzato nelle fasi preliminari di studio, costituisce una semplificazione per materiali porosi quali gli scaffold. Per svolgere analisi più approfondite si può

introdurre un modello costitutivo più complesso come quello anisotropo che permette di considerare anche gli sforzi di taglio.

APPENDICE

Appendice A

MODEL:

Cell Types:

cell Line = MCF7
1 = Dead
2 = Stem
3 = Differentiated

Rules:

0 = 1->0, $0.38 * (TIME - TD)$
1 = 1->1, $1 - (0.38 * (TIME - TD))$
2 = 1->0, environment (Glc)
3 = 1->0, environment (O2)
4 = 2->3, $(0.01 * (Glc + O2 + AGE)) * DIFF$
5 = 2->1, $(1 * (1C + 2C + 3C) / (Glc + O2)) * DE$
6 = 2->2, $1 - ((0.01 * (Glc + O2 + AGE)) * DIFF) -$
 $((1 * (1C + 2C + 3C) / (Glc + O2)) * DE) - (0.38 * TLD / (O2 + Glc)) -$
 $(0.008 * (O2) / ((1C + 2C + 3C) + YM)) * ST$
7 = 2->2+2, $0.38 * TLD / (O2 + Glc)$
8 = 2->0+2, $0.008 * (O2) / ((1C + 2C + 3C) + YM)$
9 = 2->0.5*U, environment (Glc)
10 = 2->0.5*U, environment (O2)
11 = 3->1, $(1 * (1C + 2C + 3C) / (Glc + O2)) * DE$
12 = 3->3, $1 - ((1 * (1C + 2C + 3C) / (Glc + O2)) * DE) -$
 $(0.38 * TLD / (O2 + Glc)) -$
 $(0.008 * (O2) / ((1C + 2C + 3C) + YM)) * ST$
13 = 3->3+3, $0.38 * TLD / (O2 + Glc)$
14 = 3->0+3, $0.008 * (O2) / ((1C + 2C + 3C) + YM)$
15 = 3->U, environment (Glc)
16 = 3->U, environment (O2)
17 = 3-> 0.000003, environment (YM)

Scaffold:

material = 10000
side [cm] = 1
layers = 10
porosity [%] = 0

Stress:

strain [%] = 1
density [g/cm³] = 1.03
Poisson ratio [-] = 0.35
min stress [Pa] = 50
max stress [Pa] = 160
frequency [Hz] = 0.5

INITIAL CONDITIONS:

Cell Types:

1 = 0
2 = 100
3 = 0
total=5M

Scaffold:

seeding = Random
iterations = 240
media = RPMI
media Replace = static
frequency = 2

BIBLIOGRAFIA

1. **Fergal J. O'Brien.** Biomaterials & scaffold for tissue engineering. *Materials Today*. 2011.
2. **Ciara M. Murphy, Fergal J. O'Brien, David G. Little, Aaron Schindeler.** Cell-Scaffold Interactions In The Bone Tissue Engineering Triad. *European Cells and Materials* . 2013.
3. **Julian H.S. George.** Engineering of Fibrous Scaffolds for use in Regenerative Medicine. *Tesi dottorato*. s.l. : Imperial College London, 2009.
4. **Kayla Duval, Hannah Grover, Li-Hsin Han, Yongchao Mou, Adrian F. Pegoraro, Jeffery Fredberg, Zi Chen.** Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology (Bethesda)*. 2017.
5. **Girdhari Rijal, Weimin Li.** 3D scaffolds in breast cancer research. *Biomaterials*. 2015.
6. **Rasheena Edmondson, Jessica Jenkins Broglie, Audrey F. Adcock, Liju Yang.** Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors. *ASSAY and Drug Development Technologies*. 2014.
7. **Susan Breslin, Lorraine O'Driscoll.** Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. *Drug Discovery Today*. 2012.
8. **Brad Larson.** *3D Cell Culture: A Review of Current Techniques*. 2015.
9. **Susan Standring.** *Anatomia del Gray. Le basi anatomiche per la pratica clinica*. 2009.
10. **B.P.Chan, K.W.Leong.** Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *European Spine Journal*. 2008.
11. **Jungwoo Lee, Megan J. Cuddihy, Nicholas A. Kotov.** Three-dimensional cell culture matrices: state of the art. *Tissue Engeneering*. 2008.
12. **Qiu Li Loh, Cleo Choong.** Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering Applications: Role of Porosity and Pore Size. *Tissue Engineering*. 2013.
13. **Peter X. Ma.** Scaffolds for tissue fabrication. *Materials Today*. 2004.

14. **Tingli Lu, Yuhui Li, Tao Chen.** Techniques for fabrication and construction of three-dimensional scaffolds for tissue engineering. *International Journal of Nanomedicine*. 2013.
15. **Livia Roseti, Valentina Parisi, Mauro Petretta, Carola Cavallo, Giovanna Desando, Isabella Bartolotti, Brunella Grigolo.** Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives. *Materials Science and Engineering*. 2017.
16. **Anh-Vu Do, Behnoush Khorsand, Sean M. Geary, Aliasger K. Salem.** 3D Printing of Scaffolds for Tissue Regeneration Applications. *Adv Healthc Mater*. 2015.
17. **Niamh Plunketta, Fergal J. O'Brien.** Bioreactors in tissue engineering. *Technology and Health Care*. 2011.
18. **Ivan Martin, David Wendt, Michael Heberer.** The role of bioreactors in tissue engineering. *TRENDS in Biotechnology*. 2004.
19. **Andrew B. Yeatts, John P. Fisher.** Bone tissue engineering bioreactors: Dynamic culture and the influence of shear stress. *Bone*. 2010.
20. **Joseph Lo Vecchio.** Development of an innovative bioreactor system for human bone tissue engineering. *Tesi di dottorato*. Università di Bologna : s.n., 2018.
21. **A.Rosenblueth, David.** Computational methods for understanding complexity: the use of formal methods in biology. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology & Frontiers in Genetics*. 2016.
22. **Leslie M. Loew, James C. Schaff.** The Virtual Cell: a software environment for computational cell biology. *TRENDS in Biotechnology*. 2001.
23. **Salvatore Torquato.** Toward an Ising Model of Cancer and Beyond. *Phys Biol*. 2012.
24. **Y. Guyot, I. Papantoniou, Y. C. Chai , S. Van Bael, J. Schrooten, L. Geris.** A computational model for cell/ECM growth on 3D surfaces using the level set method: a bone tissue engineering case study. *Biomech Model Mechanobiol*. 2013.
25. **Marilisa Cortesi, Chiara Liverani, Laura Mercatali, Toni Ibrahim, Emanuele Giordano.** SALSA: a Scaffold Simulator. *in preparazione per Journal of the Royal Society Interface*. 2018.

26. **Stephen Wolfram.** Universality And Complexity In Cellular Automata. *Physica*. 1984.
27. **Kuen Yong Lee, David J. Mooney.** Alginate: properties and biomedical applications. *Prog Polym Sci*. 2012.
28. **Molly M. Stevensa, Hala F. Qanadiloo, Robert Langer, V. Prasad Shastri.** A rapid-curing alginate gel system: utility in periosteum-derived cartilage tissue engineering. *Biomaterials*. 2003.
29. **Andrea Fioravanti.** Scaffold di alginato, misure non distruttive. *Tesi di laurea magistrale*. 2017.
30. **Saroj K Basak, Raj Batra.** Cancer stem cells, microRNAs, and therapeutic strategies including natural products. *Cancer and metastasis*. 2012.
31. **Sarah Sundelacruz, David L. Kaplan.** Stem cell- and scaffold-based tissue engineering approaches to osteochondral regenerative medicine. *Semin Cell Dev Biol*. 2009.
32. **Hee Jung Kim, Jeong-Soo Park.** Usage of Human Mesenchymal Stem Cells in Cell-based Therapy: Advantages and Disadvantages. *PMC*. 2016.
33. **Songsong Teng, Chaoxu Liu, Daniel Guenther, Mohamed Omar, Claudia Neunaber, Christian Krettek, Michael Jagodzinski.** Influence of biomechanical and biochemical stimulation on the proliferation and differentiation of bone marrow stromal cells seeded on polyurethane scaffolds. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2016.
34. **Rozalia Dimitriou, Elena Jones, Dennis McGonagle, Peter V Giannoudis.** Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC Medicine*. 2011.
35. **Ami R. Amini, Cato T. Laurencin, Syam P. Nukavarapu.** Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges. *Crit Rev Biomed Eng*. 2012.
36. **Jinchen Sun, Huaping Tan.** Alginate-Based Biomaterials for Regenerative Medicine Application. *Materials*. 2013.
37. **Zhichao Hao, Zhenhua Song, Jun Huang, Keqing Huang, Amanda Panetta, Zhipeng Gu, Jun Wu.** Scaffold Microenvironment for Stem Cell based Bone Tissue Engineering . *Biomaterials Science*. 2017.

38. **Jong-Hoon Park, Takashi Ushida, Takayuki Akimoto.** Control of cell differentiation by mechanical stress. *J Phys Fitness Sports Med.* 2012.
39. **Akhilandeswari Ravichandran, Jing Lim, Mark Seow Khoon Chong, Feng Wen, Yuchun Liu.** In vitro cyclic compressive loads potentiate early osteogenic events in engineered bone tissue. *Society for Biomaterials.* 2016.
40. **M. Brunelli, C.M. Perraulta, D. Lacroix.** Short bursts of cyclic mechanical compression modulate tissue formation in a 3D hybrid scaffold. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials.* 2017.
41. **William. S. Slaughter.** The linearized theory of elasticity. s.l. : Birkhauser, 2002.
42. **Yuan. C. Fung.** *Biomechanics: Mechanical Properties of Living Tissues.* s.l. : Springer, 1993.
43. **Kivanç Birsoy, Richard L. Possemato, Franziska K. Lorbeer, Erol Can Bayraktar, Prathapan Thiru, Burcu Yucel, Tim H-H Wang, Walter W. Chen, Clary B. Clish, David M. Sabatini.** Metabolic determinants of cancer cell sensitivity to glucose limitation and biguanides. *Nature.* 2014.
44. **Ian Streeter, Umber Cheema.** Oxygen consumption rate of cells in 3D culture: the use of experiment and simulation to measure kinetic parameters and optimise culture conditions. *Analyst.* 2011.
45. **Andrew Bryan Yeatts, John P. Fisher.** Bone tissue engineering bioreactors: dynamic culture and the influence of shear stress. *Bone.* 2011.
46. **M. Ahearne, Y. Yang, K-K Liu.** *Topics in Tissue Engineering.* 2008.
47. **Chiara Liverani, Laura Mercatali, Luca Cristofolini, Emanuele Giordano.** Investigating the Mechanobiology of Cancer Cell–ECM Interaction Through Collagen-Based 3D Scaffolds. *Cellular and Molecular Bioengineering.* 2017.
48. **Anne V. Salsas, Liguozhang, Jean M. Gherbezza.** Measurement of mechanical properties of alginate beads using ultrasound. *AFM.* 2009.
49. **Jordan M. Cloyd, Neil R. Malhotra, Lihui Weng, Weiliam Chen, Robert L. Mauck, Dawn M. Elliott.** Material properties in unconfined compression of human nucleus pulposus, injectable hyaluronic acid-based hydrogels and tissue engineering scaffolds. *Eur Spine J.* 2007.

50. **Ting Guo, Li Yu, Casey G. Lim, Addison S. Goodley, Xuan Xiao, Jesse K. Placone, Kimberly M. Ferlin, Bao-Ngoc B. Nguyen, Adam H. Hsieh, John P. Fisher.** Effect of Dynamic Culture and Periodic Compression on Human Mesenchymal Stem Cell Proliferation and Chondrogenesis. *Ann Biomed Eng.* 2017.
51. **Tomohiko Akiyama, Saeko Sato, Nana Chikazawa-Nohtomi, Atsumi Soma, Hiromi Kimura, Shunichi Wakabayashi, Shigeru B. H. Ko, Minoru S. H. Ko.** Efficient differentiation of human pluripotent stem cells into skeletal muscle cells by combining RNA-based MYOD1-expression and POU5F1-silencing. *Scientific Reports.* 2018.
52. **Qiu Li Loh, Cleo Choong.** Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering Applications: Role of Porosity and Pore Size. 2013.
53. **Zhanpeng Zhang, Melanie J. Gupte, Peter X. Ma.** Biomaterials and Stem Cells for Tissue Engineering. *Expert Opin Biol Ther.* 2013.

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio il prof. Giordano per avermi proposto un argomento di tesi interessante e stimolante e per le attenzioni dedicate al mio elaborato. Grazie infinite alla mia correlatrice, Dott. Marilisa Cortesi, per avermi permesso di partecipare al suo innovativo progetto, per la grande disponibilità e per l'aiuto costante che mi ha fornito in tutto questo percorso. Grazie per avermi permesso di scoprire le gioie della ricerca scientifica e per avermi mostrato come affrontare, con ottimismo e determinazione, i problemi ad essa associati. Grazie al Dott. Joseph Lo Vecchio per la professionalità e la disponibilità sempre dimostratami e per tutto il materiale che mi ha fornito. Grazie alla Dott. Alice Pasini per l'interesse dimostrato verso il mio lavoro di tesi.