

**ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI
BOLOGNA CAMPUS DI CESENA
DIPARTIMENTO DI
INGEGNERIA DELL'ENERGIA ELETTRICA E
DELL'INFORMAZIONE
"GUGLIELMO MARCONI"**

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

TITOLO DELL'ELABORATO

**Screening meccanobiologico per lo studio dell'espressione genica
correlata alla riprogrammazione cellulare**

**Elaborato in:
Fondamenti di Ingegneria dei Tessuti Biologici**

Relatore

Prof. Emanuele D. Giordano

Presentata da

Niccolò Melandri

Anno Accademico 2020/2021

Indice

Introduzione	3
Capitolo 1	6
1.1 Stimolazione meccanica e risposta cellulare	6
1.1.1 Le strutture meccaniche della cellula e il modello di <i>tensegrity</i>	7
1.1.2 La segnalazione cellulare: meccanostraduzione.....	10
1.2 Biomateriali dal punto di vista meccanico: caratterizzazione alla luce del modulo elastico	14
1.2.1 Materiali metallici.....	20
1.2.2 Materiali ceramici.....	20
1.2.3 Materiali polimerici.....	21
1.2.4 Materiali compositi.....	25
1.3 Bioreattori: attuatori per colture cellulari avanzate	28
1.3.1 Classificazione dei bioreattori per tipologia di coltura.....	29
1.3.2 Scaffold e bioreattori: supporti all'avanguardia per le colture.....	31
1.3.3 La stimolazione meccanica integrata nei bioreattori.....	32
Capitolo 2	34
2.1 Stato dell'arte	35
2.2 Materiali e metodi	37
2.3 Risultati	42
2.3.1 La meccanostraduzione della riprogrammazione.....	42
2.3.2 I biomateriali nel sistema.....	47
2.3.3 Il sistema bioreattore-attuatore.....	49

2.4 Discussione.....	52
2.5 Conclusioni.....	56
Ringraziamenti	57
Bibliografia	58
Sitografia.....	61

Introduzione

Recentemente, l'interesse scientifico per il mondo cellulare ha subito una forte crescita. Ciò ha permesso di ampliare il più possibile il livello di conoscenza che ne abbiamo acquisito col tempo. Ad oggi le cellule sono studiate dal punto vista biologico, farmacologico, evolutivo ma anche e soprattutto da quello ingegneristico provocando di conseguenza un crescente impiego di risorse, sia in ambito economico che intellettuale. Tanti, infatti, sono i temi ricerca che puntano a caratterizzare l'elemento cellulare – per lo più animale – per arrivare a un uso “intelligente” in ambito medico come i tessuti di riparazione, organi artificiali, protesi ortopediche e in generale tutto ciò che può portare a vivere meglio attraverso il proprio corpo. In questo senso c'è estremo bisogno di comprendere la cellula come microcosmo complesso ma completo dal punto di vista strutturale, funzionale e comportamentale (come interagisce col modo esterno). Tuttavia, nonostante la struttura cellulare sia ormai ben nota e studiata, ancora non si hanno conoscenze approfondite circa la loro interazione con l'ambiente. Si sa che le cellule vivono immerse in stimoli di vario tipo (meccanico, termico, elettrico, chimico ecc.) con i quali viene costituita una rete complessa di signaling sia in ingresso che in uscita. In particolare, è di grande rilevanza la meccanotrasduzione, processo attraverso il quale le cellule sono in grado di percepire carichi meccanici e convertirli in risposte biologiche. È da tempo noto come segnali biologici e biochimici influenzino l'abilità cellulare nel sentire, generare e sopportare forze di tipo meccanico. Negli ultimi decenni gli studi sulla biomeccanica cellulare sono rapidamente evoluti, grazie all'applicazione di tecnologie altamente innovative per la sperimentazione, come processi di sollecitazione, misura e analisi nella scala micro e nano-metrica. Le ricerche condotte negli anni hanno portato alla comprensione delle connessioni strutturali, delle risposte biomeccaniche e delle funzioni biologiche e fisiologiche di organi e tessuti come il cuore, le ossa, i polmoni, le cartilagini e i vasi sanguigni.

Lo studio delle cellule staminali costituisce una porzione non indifferente di interesse in questo ambito, specialmente dal punto di vista ingegneristico. Le cellule staminali sono cellule non differenziate, in grado di proliferare, auto-mantenersi e differenziarsi in specifici fenotipi cellulari. Sono il precursore di ogni tessuto specializzato che risiedono nel nostro corpo: epiteliale, connettivo, muscolare e nervoso. Tutti i tipi differenziati di cellule prendono origine dalle staminali, il che le rende uno strumento altamente duttile e versatile, ma queste non sono tutte uguali, e ciò che le contraddistingue è proprio legato alla loro capacità di differenziazione a partire dallo stato primitivo. L'importanza di tali cellule sta nel fatto che la ricerca le sfrutta per terapie *cell-based*, screening di farmaci, e indagini scientifiche su molte malattie – neoplasie in primis.

Il presente lavoro si incentra sull'analisi e sulla discussione di un sistema sperimentale lo studio degli effetti della stimolazione meccanica sull'espressione di fattori per la riprogrammazione (Lee J. *et al.*, 2020): cioè si cerca di capire come i fattori di trascrizione cellulari per la riprogrammazione possano essere sfruttati attraverso la meccano-trasduzione per indurre cellule differenziate mature a “regredire” allo stato primordiale di cellula staminale, ovvero una cellula staminale pluripotente indotta (iPSC). In modo esplicito l'analisi ha come obiettivi:

- lo sviluppo di un sistema ad alto volume per la stimolazione meccanica di tipo dinamica complessa su colture cellulari;
- l'applicazione del sistema per ricercare le condizioni ottimali che stimolano l'espressione di fattori di trascrizione su fibroblasti di topo per indurre la riprogrammazione;
- l'identificazione di inibitori a piccola molecola che creino sinergia con la stimolazione meccanica per indurre la riprogrammazione.

Ai fini di questo studio, siamo interessati a quelle cellule staminali che possono essere isolate, manipolate, combinate con altri materiali, analizzate, ulteriormente ingegnerizzate e riposizionate nell'ambiente in vivo per svolgere una funzione precisa.

La trattazione si incentrerà dunque sugli argomenti cardine di questo ambito di ricerca, partendo dalla meccanotrasduzione e in generale dal processo di signaling cellulare di origine meccanica volto all'espressione genica per la riprogrammazione, passando per la comprensione dei biomateriali trattati dal punto di vista meccanico per la strumentazione e infine sulla caratterizzazione degli attuatori o bireattori impiegati.

Partendo da questi concetti si potrà poi convergere sull'analisi del sistema proposto osservando come vengano fatte interagire nozioni teoriche interdisciplinari nella strumentazione. Quest'ultima consisterà in un'analisi degli obiettivi, dei materiali e dei metodi applicati e delle conclusioni tratte attraverso la raccolta e l'elaborazione dei risultati.

Quello che questo elaborato si propone di compiere è quindi l'integrazione di nozioni teoriche apprese durante il percorso di studi, e approfondite tramite ricerca bibliografica (articoli scientifici e libri di testo) con l'esaminazione di una particolare esperienza che viene descritta nell'articolo citato.

Capitolo 1

Affronteremo in questo primo capitolo alcuni concetti fondamentali per la trattazione dell'argomento principe dell'elaborato, ovvero la caratterizzazione del sistema meccanobiologico. Vedremo più nel dettaglio una descrizione della meccanobiologia – partendo dal microambiente cellulare dal punto di vista meccanico – passando per la meccanotrasduzione, e concludendo con la meccanobiologia della differenziazione cellulare. Dopodiché analizzeremo i biomateriali sotto il profilo meccanico, in particolare definendoli alla luce del modulo elastico e per tipologie di struttura. Concluderemo infine con la descrizione degli attuatori che ci permettono di gestire colture cellulari in modo attivo, ovvero i bioreattori nelle loro molteplici sfaccettature.

1.1 Stimolazione meccanica e risposta cellulare

Le cellule all'interno del corpo umano si trovano a vivere in un microambiente tanto complesso quanto organizzato, e risultano essere estremamente sensibili ai vincoli geometrici e meccanici che esso definisce. Questo ambiente è definito da due elementi cardine: la matrice extracellulare (ECM) e la contiguità cellulare. Il microambiente cellulare impone rigidi limiti e condizioni sulla vita cellulare: dimensioni, migrazione, volume disponibile ecc. Quindi in generale non ne sono coinvolte solo proprietà di architettura e meccanica, ma anche polarità e funzioni di ogni cellula. Si può allora definire il coinvolgimento di questo microambiente nella biomeccanica cellulare tramite tre concetti fondamentali:

- le dimensioni, che influiscono su volume e diffusione cellulare;
- la struttura – quindi il posizionamento di cellule contigue posizione e orientamento di fibre di ECM – definisce le distribuzioni delle adesioni cellulari nello spazio;

- la composizione, cui si lega la rigidità, che determinano i fattori coinvolti nell'adesione delle cellule, da cui le vie di segnalazione intra- ed intercellulare.

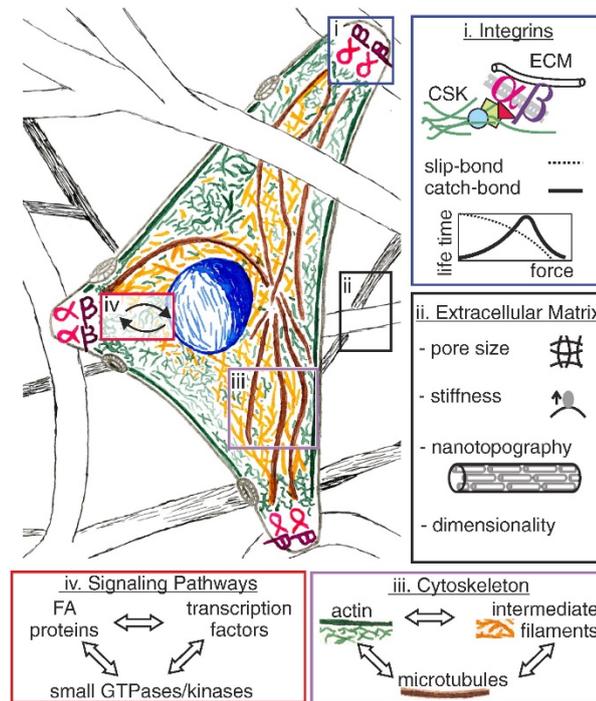


Figura 1. (Jansen et al., 2015) Rappresentazione dell'interazione meccanica cellula-ambiente (si notano le strutture di ECM all'esterno e citoscheletro all'interno). Sono evidenziati: (i) le adesioni integrina-ECM, (ii) componenti della ECM, (iii) componenti del citoscheletro, (iv) le fasi del processo di signaling cellulare.

1.1.1 Le strutture meccaniche della cellula e il modello di *tensegrity*

L'ECM è un complesso reticolo proteico che forma l'impalcatura a cui le cellule aderiscono. Fornisce supporto meccanico a cellule e tessuti ed agisce come riserva di fattori di crescita, citochine ed enzimi proteici. Questa contiene però anche componenti non strutturali che modulano le interazioni cellula-ECM. Muovendosi sotto l'influenza di forze, le proteine della ECM possono anche agire come meccano-trasduttori esponendo siti criptici e fattori di crescita (Jansen et al., 2015). Sulla base della relazione strutturale fra cellula e ECM – assieme al citoscheletro – si fonda l'elaborazione delle stimolazioni biomeccaniche dell'intero ambiente.

Il citoscheletro è una rete che riempie lo spazio citoplasmatico di filamenti proteici e permette alle cellule di mantenere la loro forma e resistenza meccanica. Consente alle cellule di sopportare forze esterne, mentre allo stesso tempo essere dinamiche e auto-deformanti. I filamenti sono di tre tipi: actina, microtubuli e filamenti intermedi,

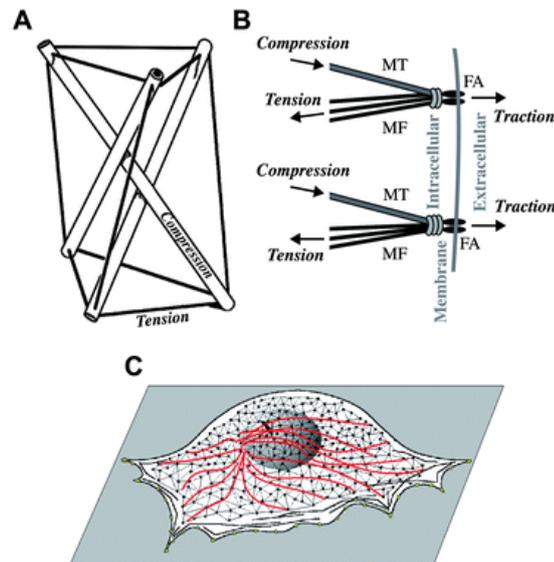


Figura 2. (Stamenovic et al., 2009) rappresentazione schematica di modello a tensegrità con focus sulle adesioni focali e schema di trasmissione delle tensioni attraverso il citoscheletro.

classificati come biopolimeri semi flessibili; essi sono inoltre altamente influenzati dalle fluttuazioni termiche. Queste reti hanno la proprietà di potersi irrigidire in risposta a sforzi di taglio o trazione (Jansen et al., 2015).

Fondamentalmente esistono e sono tutt'oggi oggetto di studio, dei modelli atti a descrivere in maniera schematica, quanto accurata, la struttura biomeccanica cellulare. Ne esistono di diversi tipi, ma tutti convergono sul concetto per cui la cellula è approssimata a una struttura con membrana elastica che circonda un citoplasma omogeneo dal carattere viscoso, viscoelastico o elastico, considerando pure il nucleo al centro. Questa visione esprime la cellula come un “pallone in tensione riempito di gelatina” (Inber, 2003). Fra questi, il modello più accettato che descriva la relazione fra ambiente meccanico e chimico, è quello definito *tensegrity*

o *tension integrity* (Stamenovic et al., 1996). I sistemi *tensegrity* sono quelle strutture che stabilizzano la loro forma secondo una tensione continua, o integrità tensionale, piuttosto che secondo una compressione continua, ad esempio come un arco in pietra (Fuller, 1961). Questa modellazione (figura 2) stabilisce che la cellula sia dunque una struttura pretensionata. Le forze di trazione hanno origine dai microfilamenti dai filamenti intermedi del citoscheletro, e tali forze sono bilanciate dagli elementi strutturali interconnessi che resistono a compressione, cioè i microtubuli (assimilati a puntoni) interni, e ai domini di adesione cellulare. L'adesione cellulare è un fenomeno di rilevanza nella vita cellulare che coinvolge complessi proteici multi-molecolari. L'adesione cellula-ECM (o cellula-cellula) controlla l'orientamento della struttura, e il continuo rimodellamento di questi attacchi assieme al rimodellamento matriciale regolano gli spostamenti cellulari, la crescita, lo sviluppo e la riparazione. In ciascuna adesione il ruolo fondamentale è svolto da specifiche proteine di transmembrana (proteine di adesione) che attraversano la membrana con una estremità connessa al citoscheletro (parte strutturale interna) e una alla ECM (parte strutturale esterna). Le più note fra queste molecole sono le interine. Queste proteine sono tanto particolari quanto utili alla cellula. Oltre ad attivarsi tramite legame chimico a specifici recettori sull' ECM e citoscheletro, reclutano anche grandi macromolecole all'interno della cellula stessa (per attivare la segnalazione) formando le cosiddette adesioni focali (AF). La loro conformazione può variare da piegata a stirata, il che è tutto ciò che serve sapere per capire come operano nella meccano-trasduzione. Lo stress applicato sulle strutture cellulari si trasmette da matrice e citoscheletro alle interine, questo le porta a cambiare conformazione e quindi a variare l'interazione biochimica delle sue subunità con il citoplasma, è qui che si innescano i meccanismi di rilascio molecolare: ha inizio il signaling. Un altro tipo proteico fondamentale per la meccanotrasduzione sono i più semplici canali ionici che possono essere letteralmente stirati o compressi in base alla deformazione della membrana – cui sono vincolati – sotto stress meccanico.

1.1.2 La segnalazione cellulare: meccanostraduzione

In linea generale, la segnalazione cellulare è iniziata dalla secrezione di un ligando, da parte di una cellula mittente per indurre un cambiamento fisiologico una cellula destinataria. Il pathway costituisce una cascata di eventi bio-meccano-chimici che portano a due strade: o l'espressione genica di fattori di trascrizione o una diretta espressione genica specifica (figura 3). In termini pratici questa risposta si riflette sul comportamento della cellula in quanto a ciclo cellulare, metabolismo, proliferazione, differenziazione, rimodellamento e produzione di ECM (Blitterswijk et al., 2014).

Per la maggior parte degli eventi e processi di segnalazione cellulare, è stato riscontrato esistere un paradigma ben definito di tre step:

1. *Iniziazione del segnale*: un ligando extracellulare si lega a un recettore sulla superficie cellulare. Il legame col ligando cambia l'attività o conformazione del recettore e ciò porta alla trasduzione del segnale verso l'interno della cellula;
2. *Trasduzione del segnale*: il recettore attivato innesca a cascata una trasduzione del segnale nella quale sono attivate delle proteine intracellulari, che portano infine all'attivazione di un fattore di trascrizione nel nucleo;
3. *Attivazione genica*: il fattore di trascrizione si lega a una sequenza di regolamento del gene bersaglio, portando all'attivazione di quel gene, quindi alla sintesi proteica e a cambiamenti nella fisiologia cellulare.

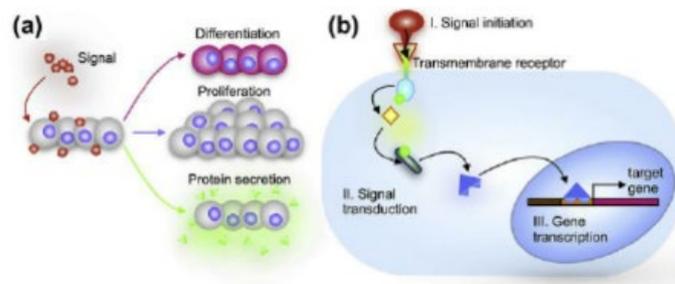


Figura 3. (Blitterswijk et al., 2014) Paradigma della segnalazione cellulare.

Possiamo considerare il processo di segnalazione in analogia a una successione di fasi che viene normalmente applicata nel campo della strumentazione elettronica per il processamento dei segnali fisici: la cellula segue grossomodo le stesse fasi. In tal senso, come evidenziato attraverso il diagramma a blocchi in figura 4, la cellula rappresenta l'elemento fulcro di questa successione, ovvero il sensore. Il sensore a sua volta consta di due componenti:

- *L'elemento sensibile primario*: il responsabile effettivo del *sensing* cioè quello che raccoglie l'informazione dal segnale entrante (stimolo meccanico) e quindi in grado interfacciarsi con la variazione della grandezza fisica da esso trasportata. È rappresentato dalle adesioni focali. Questo genera in output la variazione di una grandezza fisica da lui generata, che si manifesta in un cambio conformazionale o nell'apertura dei canali ionici, ma ancora non in grado di essere processata dal sistema;
- *L'elemento di conversione (trasduttore)*: prende in ingresso l'output del precedente che interpreta, elabora e da cui genera in uscita una risposta effettivamente interpretabile dal sistema – un segnale biochimico, cioè molecole messaggere. Sarà così in grado di restituire la risposta definitiva attraverso la trascrizione genetica.

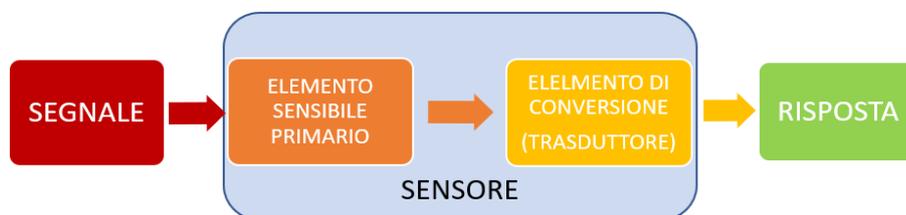


Figura 4. Schema di processamento di segnali attraverso l'elemento sensoriale e le sue sottopnenti, quali elaborazioni della grandezza fisica di ingresso trasformata nel segnale di uscita dallo specifico funzimento di sensore primario e trasduttore.

La meccano-trasduzione è il processo attraverso il quale gli stimoli meccanici vengono trasferiti dalle adesioni cellulari al nucleo, con conseguente modulazione genica e proteica che facilita la risposta adattiva. La mecano-segnalazione biochimica e la meccano-trasduzione diretta ‘fisica’ sono entrambe importanti per il trasferimento di segnali meccanici dall’ambiente extracellulare al nucleo (McNamara et al, 2012). Questo evento rappresenta quindi la fase di elaborazione dell’elemento di conversione dello schema di funzione sensoriale.

Per esempio, le adesioni focali si auto-assemblano e crescono di dimensioni quando le sollecitazioni aumentano, mentre si smontano quando le sollecitazioni vengono dissipate. Allo stesso tempo, le molecole di trasduzione del segnale presenti nell’adesione focale arrivano a modificare la propria attività. Questo si traduce nell’attivazione dell’afflusso di calcio attraverso i canali ionici sensibili allo stress, nella fosforilazione delle proteine e nell’aumento della segnalazione attraverso le vie del cAMP, delle grandi proteine G e delle piccole GTPasi. (Blitterswijk et al., 2014).

All’interno del lavoro di tesi presentato risulterà di primario interesse lo sviluppo della meccano-trasduzione inerente alla riprogrammazione cellulare, quindi su cellule, mature e già differenziate. Questo perché obiettivo dell’esperienza analizzata

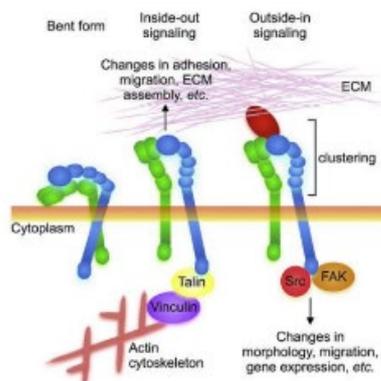


Figura 5. (Blitterswijk et al., 2014) Strutture molecolari coinvolte nel processo di trasduzione del segnale meccanico in segnale bio-chimico attraverso la membrana: in evidenza la ECM, le integrine e le loro sub-unità.

è proprio quello di verificare quanto efficacemente questo processo possa essere sfruttato per ottenere cellule staminali indotte senza impiego di modificazione genetica. Questo significa che si cerca un modo tale per cui la risposta del sistema-cellula a partire dalla recezione sensoriale dello stimolo meccanico (figura 4), sia un'espressione genica ben mirata: l'espressione di specifici fattori di trascrizione che inducano la cellula differenziata a invertire il proprio ciclo e riprogrammarsi – tornare cioè allo stato staminale – per ottenere staminali pluripotenti indotte (iPSC).

Nonostante il rapido incremento degli ultimi anni sulla ricerca – e quindi sulla conoscenza – del mondo cellulare, dalle strutture ai processi bio-chimici, ancora rimane poco esplorato il settore della meccanobiologia.

La meccanobiologia è quella branca che si occupa di studiare e apprendere i meccanismi con cui le cellule percepiscono gli stimoli meccanici e ad essi adeguano una risposta (Lee D.A., 2011). La strada rimane ad oggi molto ostacolata dall'enorme complessità dei processi meccanobiologici: difficile è capire quali e quante siano le strutture coinvolte, così come i *pathways* di segnale che si attivano negli specifici casi. E questo può essere avvalorato dal fatto che l'esperienza presa in esame per questo elaborato trovi pochi ulteriori resoconti simili in letteratura, che verranno comunque presi a confronto durante la trattazione seguente.

Vi è in particolare uno studio rilevante sull'argomento, che cerca di spiegare come i segnali fisici ricevuti dalla membrana plasmatica (PM) si integrino spaziotemporalmente all'organizzazione funzionale della cromatina del nucleo della cellula. Iyer et al. (2021) hanno infatti studiato a fondo come avvenga la propagazione delle forze all'interno delle strutture cellulari fino all'espressione di un certo gene da parte del nucleo, valutando cambiamenti nella polimerizzazione dei filamenti di actina, nella morfologia nucleare, nel rimodellamento della cromatina e nel trasporto nucleare di intermediari solubili per la segnalazione. Quello cui sono giunti è di magnifica importanza: la cromatina presenta eterogeneità nella sua lunghezza e si presenta sempre in modo aggrovigliato e compatto ma non uniformemente (a causa

dei complessi nucleosomici); ebbene tali condizioni generano come risposta agli stimoli una eterogenea fluidità meccanica, che porta probabilmente al dispiegamento di alcune regioni (che consentono così lo svolgersi della trascrizione) e non di altre, che rimangono “coperte”. Questa differente accessibilità a siti specifici del DNA potrebbe quindi essere alla base della generazione di output funzionali differenziati in base allo stimolo ricevuto. Si può però concludere affermando che ancora oggi non sia chiaro se lo specifico evento sia un processo causale e stocastico o segua un pattern sequenziale ben preciso.

1.2 Biomateriali dal punto di vista meccanico: caratterizzazione alla luce del modulo elastico

In origine venivano definiti biomateriali le “sostanze” che potevano essere utilizzate per costruire “oggetti” in grado di sostituire parti originarie di un organismo vivente danneggiate da traumi o malattie:

Biomateriale è ogni sostanza o combinazione di sostanze, diversa da un farmaco, di origine sintetica o naturale, che può essere impiegata per qualsiasi periodo di tempo, da sola o come parte di un sistema che tratta, aumenta o sostituisce un qualsiasi tessuto, organo o funzione del corpo.

Questa definizione è stata redatta nel 1982 in occasione della *Consensus development conference*, ma è poi risultata piuttosto vaga e ha avuto bisogno di modifiche e integrazioni. Si è così giunti a includere nella definizione dei biomateriali (che ha subito negli anni innumerevoli aggiornamenti) le sostanze non viventi utilizzate nella fabbricazione di dispositivi medici che abbiano in qualche modo un contatto fisico con un tessuto vivente, concetti raccolti nella definizione aggiornata dalla *Consensus development conference* nel 1986:

Biomateriale è una sostanza (materiale) non vivente utilizzata nella fabbricazione di un dispositivo medico che ha in qualche punto un'interfaccia con un tessuto vivente.

I materiali artificiali posti in semplice contatto con la pelle (arti artificiali, protesi auricolari ecc.) non devono essere considerati biomateriali, poiché la pelle agisce da barriera rispetto ai fluidi biologici.

Il biomateriale deve essere innanzitutto caratterizzato, ovvero deve essere adeguato allo scopo prefissato per la sua applicazione in geometria, forma e materia; quindi, sia dal punto di vista meccanico che chimico-biologico.

Le caratteristiche chimico-fisiche dei materiali sono responsabili nel determinare le proprietà fondamentali, che per i biomateriali riguardano, in primis la *biocompatibilità*, ma anche la bioinerzia, la biorisorbibilità, la biotossicità e la bioattività.

L'ambito di più stretto interesse per la trattazione seguente sarà quello non di biomateriali per uso medico-chirurgico, ma di ambito biologico, in particolare impiegati nella realizzazione di bioreattori; quindi, coinvolti in colture cellulari ad elevata specificità di condizioni di controllo, tutto ciò che quindi ha a che fare con l'ambiente di laboratorio biotecnologico.

I materiali classificati come biomateriali che trovano impiego nella maggior parte dei settori comprendono quattro classi principali:

1. Materiali metallici;
2. Materiali ceramici;
3. Materiali polimerici sintetici e naturali;
4. Materiali compositi.

Ogni qualvolta si necessita di un biomateriale per uno scopo specifico, si inizia riflettendo sulle caratteristiche (meccaniche, termiche, chimiche, elettriche e magnetiche) di interesse, per poi ricercare quale tipo di biomateriale fra quelli disponibili si interfacci al meglio a tali esigenze. In caso diverso sarà compito della

ricerca trovare la soluzione migliore alla richiesta per il progetto, proseguendo per la strada dell'innovazione.

In particolare, nel seguito ci interesseremo della caratterizzazione meccanica dei biomateriali, per comprendere, seppur in maniera generale, come si comportano dal punto di vista della risposta meccanica a determinate sollecitazioni o *stress*.

Le principali caratteristiche meccaniche dei materiali dipendono in gran parte dalla struttura dei materiali stessi e dai legami chimici che tengono insieme gli atomi costituenti (Pietrabbissa, 1996).

La caratterizzazione meccanica di qualsiasi tipo di materiale viene eseguita per via sperimentale: si prendono dei provini del materiale, se ne eseguono dei test di sollecitazione e se ne studiano risultati, solitamente con un approccio analitico-statistico, così da definire delle caratteristiche medie e valide per quello specifico materiale. Le prove meccaniche prevedono sollecitazioni sulla trazione, compressione, taglio, flessione e torsione. Si applicano questi stress con appositi macchinari e si valuta con sensori ad alta affidabilità la risposta del provino in termini di deformazione subita. Si raccolgono i valori con un certo passo di campionamento temporale, e infine si costruiscono grafici e tabelle da cui estrapolare i valori finali. L'analisi delle deformazioni (risposta) in funzione dei carichi applicati (stimolo) porta a definire le tensioni generate all'interno della struttura.

Ai fini della caratterizzazione, è quindi opportuno definire la relazione che intercorre fra la deformazione valutata dai sensori con il carico applicato, in una maniera che prescindano dalle dimensioni e dalla forma dell'oggetto, ma risulti appunto caratteristica specifica del materiale. Si considera allora la grandezza di *tensione unitaria* come il rapporto fra la forza applicata e l'area della superficie della sezione del provino:

$$\sigma = \frac{F}{A_0}$$

In unità di misura $\left[\frac{N}{m^2}\right]$ oppure convertita in una pressione, $[MPa]$.

E si considera la *deformazione relativa* (valore adimensionale) del provino:

$$\varepsilon = \frac{\Delta L}{L_0} = \frac{L - L_0}{L_0}$$

A questo punto si costruiscono i diagrammi tensione-deformazione con ε in ascissa e σ in ordinata.

In generale un materiale sottoposto ad una deformazione modesta, si deforma in modo reversibile, perciò, la deformazione va eliminandosi man mano che viene tolto il carico sulla struttura, fino al ritorno alla geometria originaria. Questo comportamento viene definito *elastico*. Esiste in genere un valore della sollecitazione, detto limite elastico o punto di snervamento, oltre il quale alla rimozione della sollecitazione, parte della deformazione vien mantenuta. Oltre il limite elastico il materiale, finché non incorre in rottura (fallimento strutturale) si dice che assume comportamento plastico o duttile e la deformazione residua è detta deformazione plastica (Pietrabbissa, 1996).

Riferendosi a deformazioni molto ridotte, possiamo focalizzarci sulla parte iniziale del grafico, quella ad andamento rettilineo dove la deformazione aumenta linearmente e più lentamente rispetto all'incremento in tensione. In questa parte si può dire che vale un'approssimazione molto buona di proporzionalità diretta fra tensione e deformazione, per cui vale la relazione o legge di Hooke:

$$\sigma = E * \varepsilon$$

questa legge esprime la relazione elastico-lineare per cui $\sigma = \sigma(\varepsilon)$.

Il coefficiente di proporzionalità di questa relazione, E , è definito *coefficiente di elasticità* o *modulo elastico* o *modulo di Young* e presenta le stesse dimensioni della tensione [MPa]. Per materiali la cui zona di lavoro ricade in questo intervallo, è fondamentale valutare questa proprietà meccanica per prevedere al meglio il comportamento in azione del materiale stesso, e garantire da un lato prestazioni elevate, dall'altro sicurezza rispetto a eventuali limiti e fallimenti.

Ritorniamo ora ai biomateriali, introdotti in questa sezione. Abbiamo visto il processo col quale possiamo caratterizzarli meccanicamente; vediamo ora – sempre da questo punto di vista – di definirne le 4 classi elencate in precedenza. Possiamo avvalerci del modulo elastico come parametro di classificazione in quanto sussistono evidenti differenze e peculiarità fra i materiali proprio in relazione al loro comportamento elasto-lineare. Iniziamo presentando attraverso il seguente grafico (figura 6) i range caratteristici per ciascun tipo di materiale.

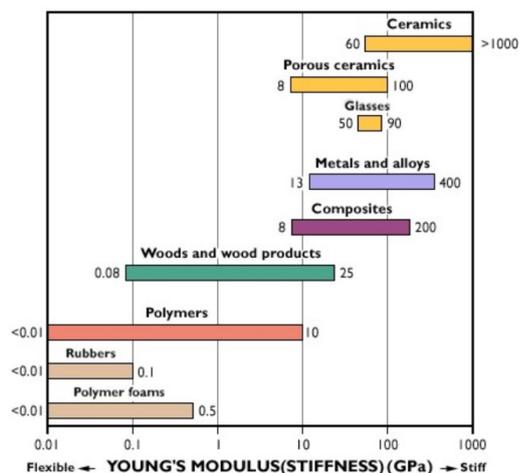


Figura 6. (vedi sitografia) Confronto fra il modulo di Young di diversi fra i principali materiali ingegneristici.

Come si può facilmente osservare, i materiali più rigidi risultano essere le ceramiche (cui si accorpano anche i materiali vetrosi), seguono i metalli, poi i materiali compositi e infine (tralasciando il legno) i polimeri e le gomme. Ma l'osservazione di solo questo grafico non è sufficiente a caratterizzare un materiale dal punto di vista meccanico. Come suggerisce il grafico di figura 7, dalla disposizione (approssimativa) delle curve dei rispettivi materiali possiamo osservare come i comportamenti siano molto differenti fra di loro, proprio per l'inclinazione che il tratto iniziale descrive.

Mentre la tabella 1 permette di avere un rapido riscontro in termini numerici fra queste grandezze, ciascuna delle quali sarà poi presa in esame di seguito.

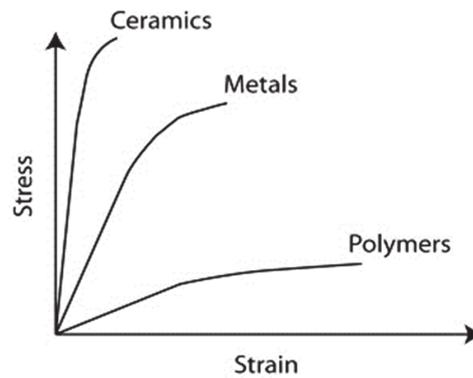


Figura 7. (Moslemi Petrudi et al., 2020) Confronto di tipiche curve sforzo deformazione per le trsa classi principali di biomateriali: ceramici, metalli e polimeri.

MATERIALE	MODULO DI ELASTICITÀ (GPa)
METALLI	70-230
CERAMICI	10-400
POLIMERI	2-8
COMPOSITI	-

Tabella 1. Intervalli standard di rigidità per le principali classi di biomateriali.

1.2.1 Materiali metallici

I materiali metallici sono costituiti da una struttura molecolare ben precisa: si tratta di conformazioni cristalline a celle unitarie costanti, tipicamente a facce o corpo centrati ed esagonale. Questa struttura, assieme al tipo di legame metallico fra gli atomi conferisce un comportamento meccanico specifico: i metalli sono elasto-plastici. Questo significa che sono duttili, quindi ben deformabili e presentano un punto di snervamento oltre il quale la linearità non vige più. I motivi della loro grande applicazione sono:

1. Hanno elevati moduli elastici (fra i 100 e 200 GPa) ed un elevato carico di snervamento (fra 9 300 e 1000 MPa)
2. Hanno una buona duttilità e se il carico supera il limite elastico si deformano in maniera plastica, il che permette grande prevenzione sulla rottura;
3. Hanno un'elevata resistenza alla fatica meccanica, quindi sono indicati per quelle applicazioni che richiedono cicli di carico;
4. Possono essere lavorati usando gran parte delle tecnologie industriali;
5. Se si cura con attenzione la fase di finitura in fase di fabbricazione o trattamento, possono ottenere un'ottima biocompatibilità.

I metalli in ambito biomedico difficilmente trovano impiego come materiali puri; invece, è più probabile che vengano combinati assieme in delle leghe, che portano a caratteristiche combinate più elevate sotto molti punti di vista.

È quindi fondamentale sottolineare che le proprietà meccaniche dei materiali metallici possano dipendere non solo dalla cristallinità, o dai processi tecnologici impiegati, ma anche dalla percentuale di ciascun materiale presente nella lega.

1.2.2 Materiali ceramici

I biomateriali ceramici sono stati sviluppati in alternativa ai metallici per migliorare le prestazioni degli impianti in termini di biocompatibilità.

Sono materiali composti a livello molecolare da una combinazione di elementi metallici e inorganici non metallici tenuti assieme da legami ionici. Generalmente si

presentano come solidi policristallini, ma possono trovarsi anche in forma amorfa o monocristallina. Questa caratteristica chimica sta alla base della definizione delle proprietà meccaniche del materiale: questi sono infatti tipicamente a costituzione granulosa, il che li rende estremamente fragili.

La *fragilità* definisce il comportamento opposto della plasticità: un oggetto si rompe in modo fragile quando superato il carico massimo di elasticità, si rompe definitivamente, senza deformazioni ulteriori. I bioceramici quindi si comportano diversamente a compressione (hanno i massimi valori di carico sopportabile fra i materiali) e a trazione, sforzo per cui hanno resistenze inferiori. Questo li rende oltre che fragili anche materiali molto *duri*, con coefficienti di attrito superficiale estremamente bassi. Flessione e taglio sono i più critici. In tal senso la curva sforzo-deformazione di questa tipologia è definita nel solo campo elasto-lineare (tratto iniziale) e i parametri per descriverla si limitano al modulo elastico e i relativi valori massimi di tensione. Valori tipici di modulo di elasticità ricadono nell'intervallo 10-400 GPa, appunto assumendo valori molto elevati.

1.2.3 Materiali polimerici

I polimeri comprendono una vasta gamma di tipi di molecole, a volte con minime variazioni dalle une alle altre ma con importanti proprietà diversificate che si manifestano a livello macroscopico. I polimeri si dividono in sintetici e naturali, e si presentano con molecole a catena lunga o corta, lineare, ramificata o retificata, ma tutte sempre con un elemento di base: il monomero, ovvero la molecola unitaria che da sola o in combinazione con altri monomeri dà vita alla macromolecola. In tal senso i polimeri sono composti da legami covalenti – i legami primari fra i monomeri – e forze di Van der Waals o legami a idrogeno – più deboli, che creano le connessioni intermolecolari. Definire in modo univoco le proprietà meccaniche dei polimeri non è possibile a causa della loro dipendenza da molteplici fattori. Prenderemo qui in esame il caso dell'influenza della disposizione delle catene, del grado di cristallinità e della temperatura di lavoro.

Si può però definire il comportamento generale come un comportamento *viscoelastico*: la viscosità è la proprietà per cui la deformazione di un materiale risulta tempo-dipendente, in opposizione a un carattere idealmente elastico. Essa si manifesta in base a quanto velocemente la deformazione viene imposta, e definisce il ritardo di risposta di un materiale al carico esterno di tipo istantaneo. La caratterizzazione meccanica dei materiali mette in evidenza come a velocità di deformazione maggiori corrisponda un irrigidimento del materiale, mentre a velocità minori il corpo riesce ad adattarsi meglio alle condizioni e risulta in una maggior plasticità. Ovviamente la viscoelasticità combina i due caratteri elastico e viscoso assieme. In genere i polimeri hanno moduli elastici intrinsecamente variabili, crescenti con l'aumentare della velocità di deformazione (figura 8).

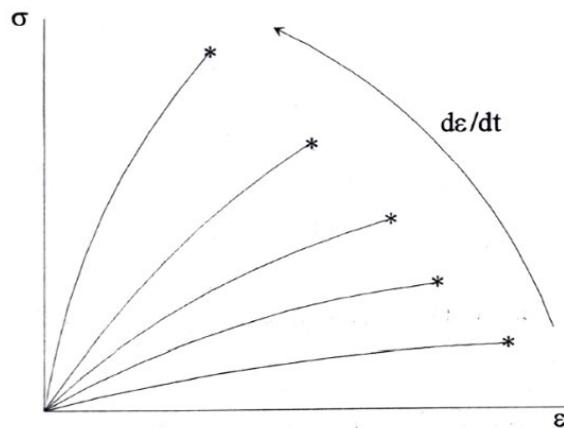


Figura 8. (Pietrabissa, 1996) Variazione della rigidità dei polimeri in funzione della velocità di deformazione imposta (termine $d\epsilon/dt$).

Una prima caratterizzazione la si può fare basandosi sulla forma della catena: polimeri a catena reticolata hanno solitamente proprietà meccanica maggiori rispetto a quelli a catena lineare o ramificata. I secondi presentano infatti legami intermolecolari molto deboli, quindi molto facili sia da rompere che riformare: basta cioè un minimo sforzo meccanico per far scorrere le molecole. E quando si generano scorrimenti, quindi deformazioni ampie e facilitate, è lì che si definisce la viscosità.

I polimeri variano anche in base al grado di cristallinità, cioè in base alla percentuale di fase cristallina presente rispetto alla fase amorfa:

- si parla di *fase amorfa* quando le lunghe catene si dispongono a groviglio aggomitato. Questa fase determina un comportamento maggiormente deformabile dei polimeri: si ha maggiore distensibilità;
- si parla invece di *fase cristallina* quando le molecole a catena si dispongono in maniera allineata, e compatta il che determina carattere più rigido: maggiore opposizione all'estensione e allo scorrimento.

In definitiva un grado di cristallinità crescente descrive i polimeri in base alla rigidità (figura 9) come:

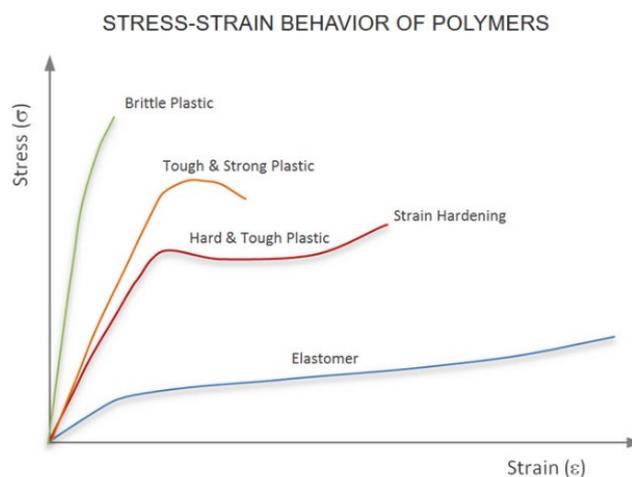


Figura 9. (vedi sitografia) Diversi comportamenti in termini di rigidità per polimeri a differente grado di cristallinità: tratto verde, polimero rigido, a fase cristallina elevata; tratti arancione e rosso, polimeri duttili e plastici, a media fase cristallina, tratto blu, elastomero, polimero ad elevata deformabilità, struttura amorfa.

- elastomeri (bassa cristallinità, amorfismo) a basso modulo elastico quindi molto deformabili;
- plastici (media cristallinità) a modulo elastico intermedio e, prevedendo quindi una fase lineare e una plastica, con un punto di snervamento;

- rigidi (alta cristallinità) a modulo elastico più elevato, si deformano poco e per carichi oltre un certo limite incorrono in fratture.

Infine, le proprietà vengono definite anche attraverso la temperatura di lavoro. In particolare, il modulo elastico dei polimeri risulta essere una funzione della temperatura: $E = E(T)$.

Vengono definite due temperature specifiche per ciascun tipo di polimero che determinano insieme tre intervalli di lavoro al variare di T:

- temperatura di transizione vetrosa T_g ;
- temperatura di rammollimento T_r ;

a volte si aggiunge anche la temperatura di fusione T_m .

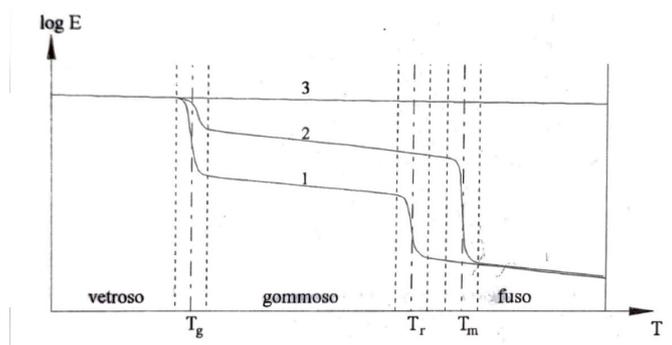


Figura 10. (Pietrabissa, 1996) Descrizione grafica della dipendenza del modulo elastico di un polimero dalla temperatura di lavoro. il comportamento è diversificato per tre tipi di polimero in base al grado di cristallinità: (1) polimero amorfo; (2) polimero a bassa cristallinità; (3) polimero ad alta cristallinità

I polimeri a struttura amorfa passano da una iniziale fase vetrosa, tendenzialmente più rigida (E elevato), a una fase gommosa, fra T_g e T_r , con rapido decremento di E nell'intorno della prima temperatura critica, per finire in uno stato semifluido (E molto basso) al di là di T_r (o T_m). La variazione di E con la temperatura è molto più evidente per polimeri amorfi, rispetto a quelli a grado di cristallinità maggiore: al crescere della fase cristallina il modulo elastico tende a rimanere costante al variare

di T (poca o scarsa dipendenza). Le fasi e i tre diversi comportamenti sono descritti dal grafico in figura 10.

Il grafico di figura 11 mette invece in luce la doppia variabilità del modulo elastico dei polimeri indipendentemente dalla struttura molecolare o dal carico applicato, ma solo in funzione di variazioni di temperatura di lavoro e di velocità di deformazione, il che risulta in un contrasto fra i due parametri, secondo la loro variazione positiva: il modulo di Young aumenta se la temperatura cala o se la velocità aumenta.

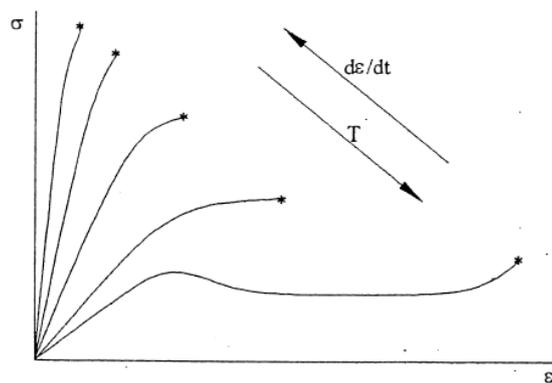


Figura 11. (Pietrabissa, 1996) Comportamento meccanico combinato fra l'influenza della temperatura e la velocità di deformazione.

1.2.4 Materiali compositi

Sono formati dalla combinazione di due o più materiali fra metalli, ceramici e polimeri. Questi elementi combinati vengono chiamati materiali costituenti e si dividono in *matrice* (componente a fase continua, di supporto e integrazione) e *struttura di rinforzo* (componente a fase discontinua, quello che definisce le maggiori proprietà meccaniche).

Questa classe di materiali necessita di test per la caratterizzazione meccanica.

Uno dei casi più semplici da definire è un materiale con matrice duttile e una fase di rinforzo a fibre lunghe e allineate, abbinata a test con carichi esterni applicati

parallelamente e trasversalmente alle fibre stesse. Trattandosi di materiali *composti* è utile considerare prima di tutto la percentuale di presenza delle due fasi, definita dal volume della parte di rinforzo sul volume totale V_f , e i rispettivi moduli elastici di fase continua E_m , di fase discontinua E_f e di fase complessiva E_c (combinazione delle due). In modo generale si approssima la rigidità complessiva come indicato nel

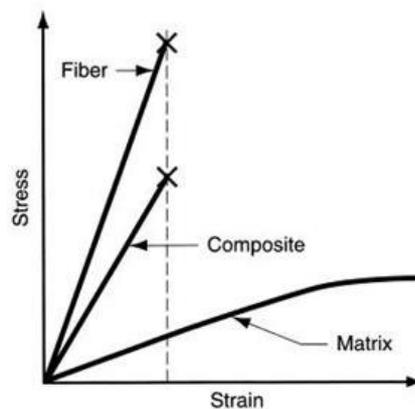


Figura 12. (Alexander, 2016). Combinazione delle diverse rigidità dei materiali costituenti un materiale composto generico.

grafico in figura 12, ovvero come una media fra le due singole rigidità.

In particolare, esistono due modelli materiali composti come sopra identificati. e uno per sollecitazioni trasversali, in cui le fibre si dispongono in serie.

Il primo modello è il modello di Voigt per la caratterizzazione da carichi longitudinale – in cui le fibre costituiscono un sistema in parallelo, rispetto alla trasmissione del carico – secondo cui, finché le fibre sono assunte come integre, lo sforzo viene equidistribuito fra matrice e rinforzo.

Come evidenziato dal grafico seguente (figura 13, tratto rosso), E_c dipende dal valore di V_f , secondo cui E_c cresce linearmente con V_f . In questo caso le componenti del composto contribuiscono tutte alle proprietà complessive in proporzione alla loro concentrazione. C'è però un limite alla percentuale di fibra del composto, esso infatti non può superare una certa concentrazione per non compromettere le proprietà stesse

del materiale: quando infatti le fibre diventano troppo fitte e si toccano diventano a loro volta un punto di debolezza del materiale, che potrebbe facilitarne la rottura.

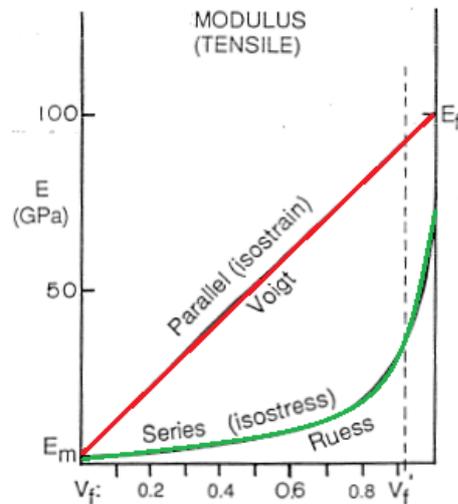


Figura 13. (vedi sitografia) Andamento del modulo elastico per ciascuna componente e di quello complessivo per un materiale a matrice duttile e fibre lunghe e allineate sotto carico longitudinale (tratto rosso, modello di Voigt) e trasversale (tratto verde, modello di Reuss)

Il secondo modello – quello per sollecitazioni trasversali, in cui le fibre si dispongono in serie – è il modello di Reuss. Anche qui viene imposta equa ripartizione dello stress fra matrice e fibre, finché queste sono integre; in più si assume che l'interfaccia matrice-fibra abbia la stessa tensione di rottura della più debole delle due solitamente la matrice. In questo caso vale sempre la dipendenza di E_c da V_f – mostrata in figura 13 dal tratto verde – da cui si evince che E_c cresce quasi linearmente con V_f ma meno rapidamente che nel modello Voigt per piccoli valori di V_f ; poi inizia a crescere molto rapidamente da quando V_f supera il valore 0.5. Le differenze fra i due modelli sono rese esplicite nell'andamento comparato di E_c in funzione di V_f .

Dall'analisi unificata di questi due comportamenti si può infine estrapolare il grafico sforzo deformazione complessivo, che rimanda proprio a quanto detto poco sopra (grafico di figura 12) ovvero il fatto che il modulo elastico complessivo E_c , è il risultato della combinazione dei due singoli moduli di E_m e E_f .

1.3 Bioreattori: attuatori per colture cellulari avanzate

La definizione di un bioreattore può essere espressa da diversi punti di vista. In linea generale può essere descritto come segue:

un bioreattore è un dispositivo che fornisce il sistema di un trasporto di sostanze nutritive alle cellule e la rimozione efficace di prodotti tossici o inibitori del metabolismo cellulare (Cancedda, 2002).

Sono bioreattori quindi anche tutti i dispositivi che consentono la crescita autonoma (cioè che non richiede un continuo intervento di un operatore) di cellule o tessuti. Questo concetto assimila il bioreattore a uno sviluppo innovativo delle colture cellulari, ed è quello su cui baseremo le seguenti considerazioni.

I bioreattori sono a tutti gli effetti degli attuatori, ovvero dispositivi che attraverso un meccanismo agiscono su un ambiente (cellulare). Il modo con cui agiscono comprende molteplici alternative, il che sta alla base della loro attuale importanza: per via chimica, meccanica, elettrica, magnetica ecc.

Risultano quindi degli strumenti a tecnologia altamente avanzata e che ricadono nell'ambito dell'ingegneria dei tessuti, ovvero la branca scientifica volta a persuadere il nostro organismo a ricostruire tessuti od organi che non sono capaci di rigenerarsi autonomamente e in modo spontaneo. Allo stato attuale, l'impiego di tessuti ingegnerizzati non ricade solo nella riparazione di defezioni nell'organismo, ma permette anche di ricavare modelli di tessuti ex-vivo che consentono di accelerare e sviluppare la ricerca sui farmaci e terapie cellulari avanzate.

Un aspetto fondamentale dei bioreattori sta nella semplificazione e nel supporto dato al monitoraggio dei parametri fondamentali per la crescita cellulare, rispetto alle modalità più "tradizionali" di colture. In particolare, grazie a particolari sensori applicati alle camere di coltura si possono registrare:

- pH;
- concentrazione di gas (p.e. CO₂ e O₂) disciolti nel terreno;
- concentrazione di ioni inorganici (p.e. Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Cl⁻, PO₄³⁻) nel terreno di coltura;
- concentrazione dei carboidrati (p.e. glucosio e lattosio) nel terreno di coltura.

Queste grandezze possono essere misurate dai gas e liquidi in uscita dall'ambiente. Nelle colture statiche (le "classiche" colture di laboratorio, realizzate per esempio su dischi di Petri e lasciate poi ferme negli incubatori) il maggior problema riguarda l'accesso che le cellule hanno ai nutrienti: qui il trasporto di massa si basa sulla sola perfusione, ed è quindi limitato a decimi di millimetro (Tandon et al, 2013). I bioreattori offrono soluzioni a questo problema, come l'agitazione, la perfusione attiva e carichi dinamici, applicati per fornire trasporto convettivo e consentire lo sviluppo dei tessuti su una scala da millimetrica a micrometrica.

Questi strumenti vengono tipicamente impiegati nell'industria biomedicale per la coltura di cellule o batteri su larga scala con un'efficace distribuzione dei nutrienti. Sono almeno quattro in questo settore le caratteristiche di più rilevanza per un bioreattore

1. Generazione di pattern di flusso del terreno di coltura per un sistema di scaffold tridimensionali efficiente e uniforme;
2. Aumento del trasporto di nutrienti e gas all'interno del terreno di coltura ai costrutti ingegnerizzati;
3. Stimolazione fisica (idrodinamica, meccanica) dei costrutti durante il loro sviluppo;
4. Controllo online dei parametri chimico-fisici della coltura, quali pH e la concentrazione di gas e metaboliti nel terreno di coltura (Cancedda, 2002).

1.3.1 Classificazione dei bioreattori per tipologia di coltura

Per la trattazione che faremo in seguito ci interessiamo alla classificazione dei bioreattori in base al tipo di coltura. Ricordiamo che altre classificazioni di questi

dispositivi si possono basare sull'asetticità del contenitore o sulle condizioni richieste dal bio-processo.

Esistono ad oggi cinque tipi di bioreattore per tipologia di coltura e tutti si differenziano attraverso il metodo di somministrazione dei nutrienti:

- *Colture in batch (sistema chiuso)*: il volume di terreno di coltura rimane essenzialmente costante nel tempo. Le cellule in crescita aumentano la loro biomassa e vanno a ridurre la quantità di nutrienti disponibili (aumentando quella dei prodotti di scarto). Questi si portano quindi a un livello di sostanziale equilibrio (stato stazionario) tale da impedire di aumentare ulteriormente il loro numero;
- *Colture in fed batch (sistema chiuso alimentato)*: applicazione che consente di prolungare il tempo disponibile alle cellule per crescere e proliferare prima di raggiungere lo stato stazionario attraverso una continua aggiunta di nutrienti rispetto allo stato di partenza;
- *Colture in perfusione*: rispetto alla tipologia precedente è previsto anche il prelievo del terreno di scarto e i metaboliti escreti. Ampiamente impiegato per colture di cellule animali. L'aumento del trasferimento di massa è determinato nel modo più diretto dalla generazione di un flusso idrodinamico. Il movimento del terreno di coltura può provenire ad esempio da pale messe in movimento da un motore, o per agitazione delle piastre di coltura, e ha come risvolto quello di determinare sforzo di taglio dinamico sulla superficie del costruito, implementato il trasferimento stesso di massa;
- *Colture continue o semicontinue*: si parte come base dalla coltura in batch. A questa però si aggiunge una fase di prelievo degli scarti con una equivalente somministrazione di terreno fresco in concomitanza al periodo di massima crescita cellulare (fase esponenziale). In questo modo ci si assicura costanza nella biomassa cellulare e una crescita pressoché bilanciata; infatti, concentrazioni di nutrienti disponibili e sostanze escrete rimangono proporzionalmente bilanciate;

- *Colture su strato solido per batteri*: avvengono in assenza di acqua allo stato libero. Tra i substrati solidi maggiormente impiegati si trovano: legume, cereali e altri materiali di origine vegetale.

1.3.2 Scaffold e bioreattori: supporti all'avanguardia per le colture

Quando lo scopo di un bioreattore verte sulla realizzazione e l'accrescimento di tessuti differenziati e specifici per effettuare sia test che riparazione in vivo, una soluzione di largo interesse riguarda la creazione di *scaffold* ovvero strutture create in biomateriali che fungono da supporto fisico per la proliferazione e differenziazione del tessuto stesso. Il complesso viene integrato coi bioreattori per eseguire dapprima l'inseminazione cellulare sullo stesso, e poi per assicurare alle cellule il terreno di proliferazione più adatto possibile alle loro esigenze chimico-fisiche. Lo scaffold trova per esempio ampio impiego nella realizzazione di porzioni di tessuto per protesi biologiche in campo osseo, cartilagineo, tendineo, vascolare e cardiaco, ma anche nello studio in vitro di specifici tipi cellulari, come ad esempio le cellule staminali. Questo poiché avere un supporto fisico di questo tipo – anziché un semplice terreno fluido o semi-solido come nelle classiche colture – fornisce le condizioni per applicare stimolazioni esterne sulle cellule che ivi aderiscono; si intendono sollecitazioni di tipo chimico, meccanico, elettrico, magnetico ecc. Agire sullo scaffold significa agire indirettamente sulle cellule, e quindi modulare o semplicemente monitorare a scopo di indagine la loro risposta e l'interazione con l'ambiente.

Gli scaffold in realtà rappresentano un filone a sé stante e molto vasto all'interno dell'ingegneria dei tessuti, che va dalla ricerca sui materiali, allo studio delle forme e geometrie, per finire alle tecniche di realizzazione, soprattutto la stampa 3D. Per quello che ci riguarda risultano essenziali i supporti di crescita bidimensionali (strutture planari) a carattere deformabile – come delle membrane. Strutture che una volta insemiante possono essere stirate e sollecitate per trasmettere forze di trazione o compressione alle cellule. Stiamo quindi parlando di colture di tipo mono-strato,

senza particolari scopi di riprodurre tessuti in-vitro, bensì per lo studio delle risposte cellulari a specifici tipi di stimolazione.

1.3.3 La stimolazione meccanica integrata nei bioreattori

Un ruolo fondamentale nei bioreattori più completi è rappresentato dalla stimolazione meccanica applicata sulle cellule da parte di attuatori esterni. Queste forme di sollecitazione possono agire sia nella forma di stress di taglio, generato dai flussi di perfusione, sia come stress meccanico direttamente applicato sul supporto fisico della coltura; in ogni caso deve essere presente un qualche tipo di sistema – integrato con il bioreattore – responsabile di queste stimolazioni. Alcuni esempi classici sono: pale rotanti che muovono il fluido nel terreno di coltura, membrane elastiche deformate a pressione idraulica oppure fibre elastiche deformate per trazione o compressione.

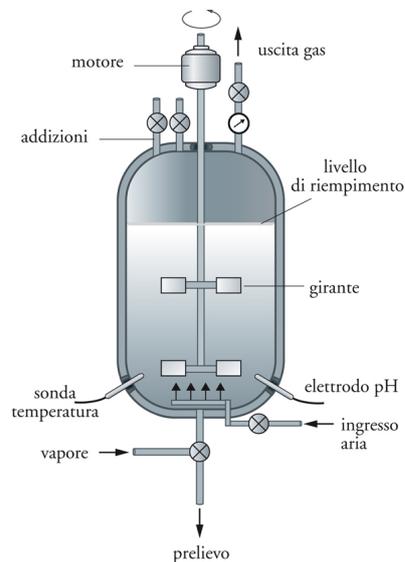


Figura 14. (Manzoni, 2008) Rappresentazione schematica di un bioreattore a perfusione con pale rotanti, in cui la stimolazione meccanica avviene per flusso idrodinamico, quindi per sforzo di taglio sulle cellule all'interno.

Innumerevoli studi hanno ampiamente affrontato l'influenza di stimolazioni meccaniche sull'ambiente cellulare. La risposta che viene modulata dalle cellule è stata affrontata nel paragrafo 1, e viene definita meccanotrasduzione. Questa viene espressa attraverso rimodellamento della ECM, accelerazioni nella proliferazione cellulare, differenziazione, riprogrammazione e modifiche al metabolismo cellulare. Uno dei risultati di maggiore interesse per la ricerca riguarda il fatto che la risposta a forze fisiche subite dalle cellule stesse sia dipendente da innumerevoli fattori, fra cui la direzione di trasmissione del carico e la sua intensità, o ancora la frequenza del ciclo di stimolo (Cancedda, 2002). L'ingegneria trova massima espressione proprio in questo punto dello sviluppo: capire dove e come sul supporto è più opportuno che l'attuatore sviluppi il carico per ottenere specifici tipi di risposta da parte della coltura.

In generale, i sistemi di coltura in-vitro che applicano questa modalità di stimolo sono anche, nei casi più sofisticati, un'approssimazione molto semplice dei più complessi sistemi che operano a livello dei tessuti in vivo. L'obiettivo cui tende questa strada è quindi quello di sistemi a complessità crescente e che mirino alla miglior simulazione possibile dei sistemi biologici in vivo.

Capitolo 2

Verrà di seguito esposto e analizzato il lavoro presentato dal gruppo di ricerca Lee et al. Tale esperienza è stata elaborata nel 2019 in forma di articolo dal titolo «A high throughput screening system for studying the effects of applied mechanical forces on reprogramming factors expression»; è stata quindi approvata e pubblicata l'anno successivo sull'archivio online PubMed.

L'articolo (Lee et al, 2020) tratta di un sistema di screening ad alto volume di produttività per lo studio degli effetti di specifiche forme di stimolazione meccanica sui fattori di riprogrammazione cellulare, applicati a colture cellulari di fibroblasti di topo. La via seguita dall'esperienza descritta è quella del raffinamento e ottimizzazione di protocolli per ottenere iPSCs tramite la risposta che le cellule generano rispetto a certi tipi di stimolazione fisica rispetto all'ambiente di crescita e di sviluppo in cui si trovano. Quella di basarsi su fenomeni e stimoli meccanici, risulta la grossa e potenziale alternativa ai protocolli tradizionali. Questi si basano infatti su due concetti primari: o l'impiego di induttori chimici e biomolecolari (quindi molecole che interagendo con le cellule le inducono a una determinata risposta genica), oppure per modificazione genetica (andando quindi a intaccare direttamente alcune sequenze di trascrizione in modo "manuale"). I problemi di questi metodi classici riguardano da un lato l'efficienza e le tempistiche – spesso troppo lunghe per ottenere un sufficiente numero di iPSCs, con considerevole influenza sui costi – e dall'altro sui rischi possibili, in quanto la modifica genetica aumenta sempre il pericolo di creare mutazioni indesiderate ovvero riprogrammazioni sbagliate e aumento di tumogenicità nelle linee cellulari successive.

2.1 Stato dell'arte

Lo studio sulla preparazione di cellule pluripotenti indotte ha inizio nel 2006, con uno studio (Takahashi and Yamanaka, 2006) che riguarda proprio culture cellulari di partenza di fibroblasti di topo. È dal di qui che sono stati definiti i quattro principali fattori – gli stessi ripresi da questo articolo – per innescare l'espressione endogena di fattori pluripotenti, e sono: Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, Nanog e l'antigene SSEA1.

Ad oggi gli studi sulle forze biofisiche e sul rapporto cellula-stimolo sono in ampia fase di crescita e di attenzione. In letteratura sono già presenti molti studi sulle connessioni fra pluripotenza e ambiente meccanico, così come sul fatto che stimolazioni meccaniche possono alterare l'espressione genica di determinati fattori; in particolare, alcune tipologie portano a una induzione e mantenimento della pluripotenza, altri al contrario la riducono (Teramura et al., 2012). Altri studi ancora hanno trovato connessioni fra le alterazioni della pluripotenza e cambiamenti nella forma della cellula o nella rigidità del substrato di crescita (Macrí-Pellizzeri et al., 2015).

Per quanto riguarda la strumentazione volta a implementare questi tipi di indagine meccanobiologica, lo stato dell'arte prevede innumerevoli progetti applicativi, rigorosamente descritti sia nelle componenti che nei risultati, per esempio grazie a MacQueen et al. (2013). Dalla revisione ad opera di Brown (2000) risultano disponibili innumerevoli dispositivi: macchinari a stress di trazione longitudinale, biassiale, a incurvatura, sul piano, fuori-piano ecc. tutte alternative sicuramente molto valide e che nelle varie sperimentazioni nell'ambito della meccanobiologia hanno dato molti frutti. Ci sono però alcune applicazioni considerate personalmente di più alta rilevanza, fra tutte: il primo esempio di dispositivo a deformazione di substrati circolari e che risale al 1985 (Hasegawa et al., 1985) (figura 15 A), il primo attuatore con piastre a superficie inferiore circolare e flessibile per colture cellulari, commercializzato come FLEXercell® (Banes et al., 1985) (figura 15 B) – strumento

che si è poi rivelato di gran lunga il più richiesto e impiegato negli anni, e per ultimo il dispositivo ideato Schaffer et al. (1994) e Hung e Williams (1994), ma in modo indipendente dai ciascuno dei due gruppi, con piastre circolari ad anello pulsatili in senso verticale e con bordi esterni a basso attrito, per una distensione omogenea e biassiale del solo piano di coltura. Quest'ultima modalità rappresenta proprio l'immagine più prossima a quella applicata dal sistema in esame (figura 15 C).

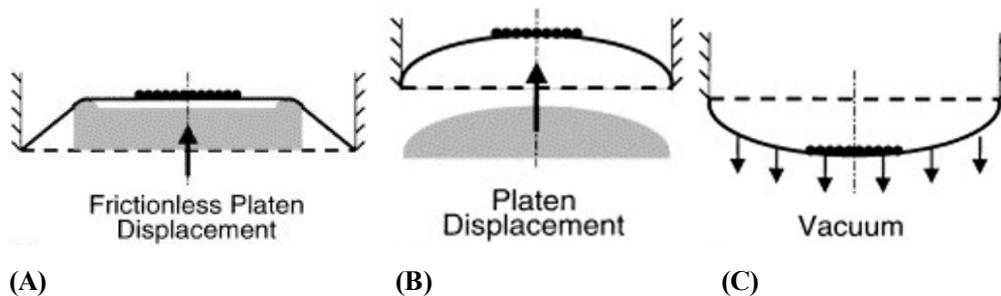


Figura 15. (Brown, 2000) Schemi di funzionamento di dispositivi per la stimolazione meccanica avanzata di colture cellulari in modo controllato. (A) Dispositivo da Schaffer et al. (1994) e Hung e Williams (1994) con spostamento del piano di coltura ad assenza di attrito. (B) Dispositivo che applica lo strain dallo spostamento del substrato circolare deformabile da Hsegawa et al. (1985). (C) Funzionamento del dispositivo Flexercell® con generazione del vuoto, da Banes et al. (1985).

Le informazioni che provengono da questi studi sono parecchie, ma tipicamente alcuni problemi affliggono questi macchinari: i sistemi che usano motori rotazionali con una camma che guida il pistone hanno il limite di poter generare una sola forma d'onda di stimolo in funzione del tempo, a meno di cambiare camma; i sistemi pneumatici hanno invece il limite di poter applicare una singola deformazione alla volta, con risvolti negativi sull'ampiezza del volume di indagine. Molto spesso invece, i sistemi che riescono a ottenere alti volumi di produzione trovano compromessi sull'uniformità, sulla dinamica, e sulla robustezza degli stimoli applicati, che calano in qualità.

Come già introdotto, l'articolo si è posto di perseguire nel dettaglio tre obiettivi, per costruire un'analisi il più solida possibile sulla base di quello che è stato possibile osservare sperimentalmente.

Prima di tutto c'è lo sviluppo di un sistema fisico (una piattaforma), che permetta di stimolare un elevato volume cellulare in maniera dinamica, specifica, regolabile, e differenziata.

Al secondo posto c'è l'effettiva applicazione del dispositivo, per eseguire attraverso la disponibilità a lavorare su un alto numero di cellule contemporaneamente, uno screening ad alto volume per la ricerca delle condizioni meccaniche ottimali che accentuino l'espressione dei fattori di trascrizione per la riprogrammazione a iPSCs di fibroblasti di topo.

Infine, l'identificazione di inibitori *small-molecule* per accentuare l'espressione genica in sinergia con la stimolazione meccanica. Gli inibitori *small-molecule* altro non sono che molecole sintetizzate chimicamente a scopo terapeutico e a bassissimo peso molecolare, capaci di agire attraverso recettori ed enzimi in modo sia intra che extra cellulare (Navarra et al, 2019).

2.2 Materiali e metodi

La struttura dell'articolo costituisce sostanzialmente la descrizione del protocollo messo in atto per perseguire questi obiettivi. Materiali e metodi riguardano quindi sezioni specifiche, appositamente strutturate in paragrafi nei quali vengono affrontate nel dettaglio tutte le tipologie di strumenti, applicazioni, protocolli standard e metodi di raccolta dei risultati impiegati dagli autori.

Culture cellulari

Le colture sono state preparate partendo da comuni cellule di fibroblasti embrionali – ovvero cellule somatiche di tipo connettivo – di topo (MEFs) o MEF alla 5 sottocultura, che esprimevano una eGFP (proteina verde fluorescente avanzata usata come proteina reporter) quale indicatore di espressione del fattore di trascrizione per la pluripotenza Oct4 (octamer-binding transcription 4), oppure. Si è dunque posta principalmente l'attenzione sull'espressione di questo gene, partendo proprio

dall'ipotesi secondo cui sia esso stesso il principale fattore che possa innescare la pluripotenza come risposta a stimolazione meccanica. L'indagine ha quindi verificato a fine protocollo l'ipotesi tramite un controllo incrociato con l'espressione influenzata da stimoli meccanici da parte degli altri singoli fattori coinvolti nella pluripotenza: Sox2, Klf4, c-Myc, Nanog e SSEA1

La coltura è quindi stata preparata impiegando come terreno di crescita il DMEM arricchito al 10% con siero fetale bovino, L-glutamina e penicillina/streptomina. Colture poi mantenute a 37° C e CO₂ al 5%. Successivamente sono state ottenute altre sottocolture, trattando le cellule ad ogni passaggio con lavaggio tramite soluzione tampone fosfato salino (PBS), agitazione con EDTA-tripsina, centrifugazione per 5 minuti e insemminazione su un nuovo substrato con 2,000 cellule per cm².

Set-up attuatore meccanico

È stato applicato un dispositivo *custom-made* capace di spostare una serie di pistoncini in senso verticale e in modo ciclico così che, aderendo a una membrana flessibile la possano sollecitare e stirare in modo continuo. Il sistema conta di 576 pistoncini individuali in PTFE montati su un piano rigido connesso alla struttura portante. I pistoncini sono rimovibili e ad altezza regolabile attraverso l'aggiunta di specifici spessori. Il cuore dell'attuatore risiede nel motore lineare cui è direttamente collegata la piastra con i pistoncini: si tratta di un motore lineare (a bobina mobile). Questo determina lo spostamento verticale della piattaforma con una risoluzione di movimento di 10 µm. Il controllo avviene sia in modo diretto che in retroazione, tramite software. Viene anche integrato un sistema di raffreddamento per evitare che dissipazioni di calore causate dalla corrente generata possano intaccare la temperatura di incubazione delle cellule in coltura.

Assemblaggio della membrana deformabile

Le piastre di coltura a pozzetto sono realizzate con struttura a *sandwich*. Ciascuna possiede – in forma standard – 96 pozzetti in cui vengono inserite le cellule. Le parti

costituenti sono due diverse piastre, entrambe con 96 fori allineati; quella inferiore in alluminio, quella superiore in policarbonato. In mezzo a queste è inserita la membrana in silicone con uno spessore di 0.005'' (ca. 0.13 mm) fissata con una guarnizione in gomma. Le piattaforme di coltura sono state montate sul dispositivo il giorno di inizio di applicazione del carico e fissate con 8 viti ciascuna alla piattaforma.

Calibrazione della stimolazione

Per valutare in maniera oggettiva e operatore-indipendente la deformazione – e quindi lo spostamento – della membrana rispetto alle condizioni iniziali (a carico nullo, nessuna forza applicata), sono state effettuate delle misure attraverso dei segni disegnati direttamente sulla membrana, per poi osservarne e misurarne gli spostamenti in fase di carico e scarico. Le immagini sono state acquisite con camere ad alta risoluzione e usate per valutare il dislocamento via software.

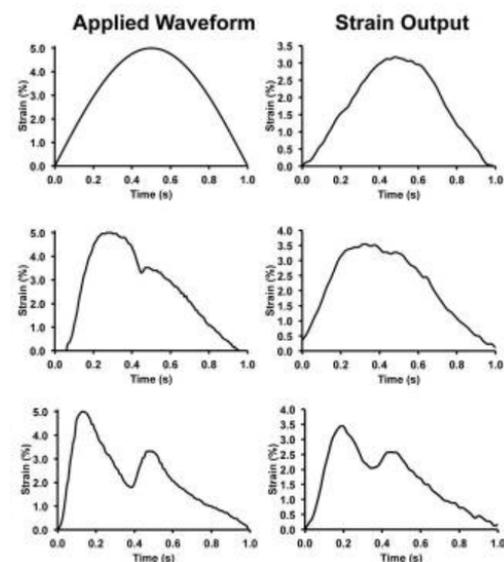


Figura 16. (Lee et al., 2019) Forme d'onda impiegate nella stimolazione cellulare nelle due forme ideale e reale (applicata cioè dallo strumento fisico sulla membrana).

Per la fase di carico dinamico, sono state scelte come già anticipato, forme di stress in forma sinusoidale e in altre due forme di tipo fisiologico: aortico e brachiale (figura

16). Per calibrare questi carichi sono state registrate prima tre prove applicate per tre cicli ciascuna con una camera a 60 fps. I valori sono poi stati mediati.

Modellazione computazionale

Siccome lo spostamento della membrana dato dallo stiramento provoca direttamente anche un moto relativo cellula-fluido, si viene a generare dello sforzo di taglio sulle colture, opportunamente valutato e quantificato dagli operatori. La parte di meccanica dei fluidi sulle cellule è stata studiata attraverso analisi a elementi finiti via software, simulando forma e geometria e inserendo i parametri appropriati per carico, frequenza densità del fluido ecc. per ottenere come risultato una valutazione quanto più affidabile possibile dello sforzo di taglio. Per fare ciò si è quindi ricercata la velocità massima e media di spostamento del fluido all'interno in diversi punti della zona di coltura. La superficie è stata deformata in simulazione con moto sinusoidale a diverse frequenze (0.5 Hz, 1 Hz e 2 Hz) e a diverse intensità di deformazione (1%, 5% e 10%). Sono poi stati ottenuti grafici e modellazioni 3D in funzione della posizione, frequenza di carico e intensità, mostrati più avanti.

Immunocolorazione

L'immunocolorazione fa parte delle tecniche di immuno-istochimica, attraverso la quale si ricercano specifiche molecole in un campione inserendo determinati anticorpi che dovranno andarsi a legare con queste specifiche proteine-recettore (accoppiamento anticorpo-antigene). L'accoppiamento, in base a come le molecole di anticorpo sono state sviluppate, innesca lo sviluppo di una ben precisa colorazione. Questa, se viene osservata dall'analisi microscopica sul saggio, garantisce che la proteina target è stata individuata. Le molecole da individuare erano ovviamente i fattori di trascrizione responsabili della pluripotenza. Gli anticorpi sono stati inseriti in due distinte fasi: prima con diluizione 1:100, poi 1:1000. È stato poi prodotto un imaging dei campioni attraverso un microscopio a laser confocale e processamento attraverso Adobe Photoshop.

Applicazione dello stress meccanico in modalità multi-strain

Per investigare nel modo più ampio ma accurato possibile l'espressione della pluripotenza mediata da stimolazione meccanica, il sistema HT-BOSS (high throughput biaxial oscillatory strain system) è stato impiegato inizialmente in una configurazione particolare. In principio si è regolata l'altezza dei pistoncini in modo graduale su tutta la piattaforma agendo sia per via statica che a stress sinusoidale per 7 giorni e per 8 ore al giorno, combinando diverse intensità di deformazione percentuale massima alla frequenza di 0.1 Hz. Questa multipla combinazione in frequenza e in intensità di deformazione (da 0.0% a 17.5% con step da 2.5%) ha permesso di ottenere le condizioni ottimali in cui agire nel complesso per ottenere la miglior risposta in termini di espressione del fattore Oct4, oltre che valutare il grado di espressione anche per SOx2 e SSEA1. Per la lettura dei risultati è stato impiegato un lettore di piastre (Varioskan; Thermo Fisher) e l'immunocolorazione con esame al microscopio.

Applicazione combinata con inibitori di chinasi

Per l'ultima parte degli obiettivi sperimentali, quindi per testare la sinergia fra l'azione della stimolazione meccanica e quella di inibitori a piccola molecola, si è deciso di agire sull'attività della chinasi cellulare. In questo caso le cellule sono state coltivate in condizioni statiche e dinamiche (forma sinusoidale o brachiale) per 4 ore al giorno, per 14 giorni (frequenza 0.1 Hz, massimo strain 17.5%). Nel frattempo, sono state trattate con speciali classi di inibitori a piccola molecola con lo scopo di individuare quali condizioni complessive (stress più azione chinasi-inibitoria) fossero le migliori nell'accentuare espressione e mantenimento della pluripotenza indotta.

Analisi dei risultati

Tutti i risultati raccolti – ed espressi per via grafica o tabulare – sono mostrati nella forma di media \pm deviazione standard. È stato considerato come statisticamente rilevante un valore di p -value ≤ 0.05 .

2.3 Risultati

Passeremo ora ad analizzare in che modo gli argomenti trattati nell'introduzione convergano all'interno del protocollo definito nell'articolo per usarli poi come strumento di interpretazione dei risultati ottenuti: la meccanotrasduzione, i biomateriali, e bioreattori a stimolazione meccanica sono infatti alla base della sperimentazione affrontata. Si proverà – nel seguito – a portare alla luce osservazioni riguardo l'importanza di questi tre concetti, per capire dove risiedano effettivamente i punti di forza di questo procedimento o se ci sono alcuni limiti che possano trovare una soluzione, ma ancora di più per capire quale e quanto possibile sviluppo ci sia per il futuro di questa ricerca.

2.3.1 La meccanotrasduzione della riprogrammazione

Come abbiamo ampiamente discusso fino ad ora, le cellule in vita, che si trovino in coltura o in condizioni fisiologiche *in vivo*, sono sensibili agli stimoli che provengono dal microambiente che le circonda. Una delle tipologie di stimolazione più affascinante quanto complessa dal punto di vista della modulazione del segnale è sicuramente quella meccanica: forze fisiche che vengono applicate sul o dal microambiente e determinano specifici carichi direzionati – tensioni e sforzi che agiscono sulle strutture cellulari. Il nocciolo della questione si concentra in quei passaggi finali in cui il segnale bio-chimico indotto all'interno della cellula dalle strutture mecano-sensitive, giunto fino al nucleo, porti effettivamente all'espressione di specifici geni. Ancora oggi su questo aspetto la ricerca ha raggiunto ipotesi molto interessanti ma non certe (Iyer et al, 2012). Quello che si sa e che si vede è che se viene sollecitata la cellula di un determinato fenotipo, con un determinato stress, allora questa esprime alcuni fattori che ne modificano la vita.

In questo caso la stimolazione viene applicata per arrivare a esprimere – e incrementarne l'espressione – dei fattori regolatori della pluripotenza, ovvero per riprogrammarla, partendo da cellule differenziate, dove ovviamente questi fattori

sono in principio silenziati (non espressi). Il paradigma del signaling è sempre quello: stimolazione, risposta bio-chimica, modificazione nucleare, espressione genica. Lo screening meccanico applicato ai fibroblasti (cellule somatiche) ha dunque avuto lo scopo di individuare e quantificare la dipendenza dell'espressione di questi fattori dalla tipologia, intensità e durata dello stimolo. È dovere però specificare come siano presenti in letteratura studi che espongono alcuni concetti rilevanti: prima di tutto il fatto che l'attivazione di SSEA1 rappresenta probabilmente solo uno stadio intermedio di pluripotenza, quindi una fase di riprogrammazione non completa (Brambrink et al., 2008), in secondo luogo è stato identificato che una sollecitazione meccanica ciclica su cellule iPSC umane agisce positivamente anche sull'attività delle proteine Rho/ROCK (regolatrici della chinasi cellulare) e che di conseguenza possa ridurre l'espressione di Nanog, Oct2 e Sox2, inibendo il processo stesso di riprogrammazione (Teramura et al., 2012).

I risultati – espressi nei grafici in figura 17 e 18 – sono stati raccolti da un lettore di piastre per Oct4, e tramite immunocolorazione per Sox2 e SSEA1; quello che evidenziano è che Oct4 ha con quasi tutti i tipi di stimolo subito incremento da 1.5 a 2.5 volte, con il massimo raggiunto a estensioni del 17.5% (valore massimo) e similmente per Sox2 e SSEA1, ma per deformazioni almeno sopra al 5%.

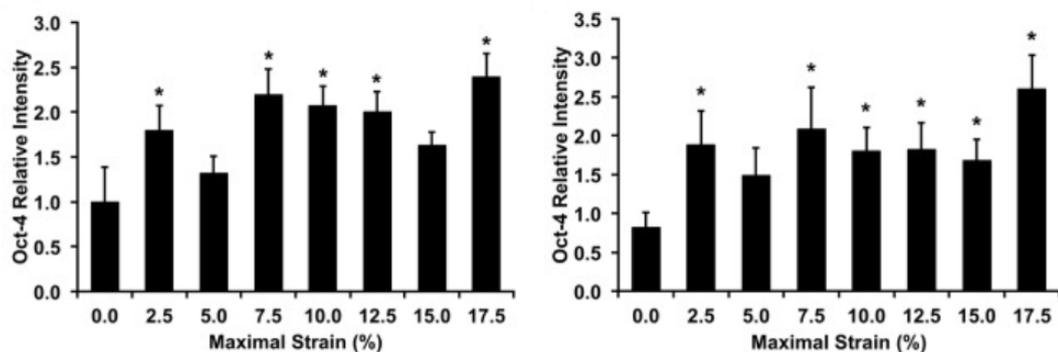


Figura 17. (Lee et al., 2019) Confronto nell'andamento dell'espressione di Oct4 in fibroblasti embrionici di topo in funzione dell'intensità di strain dopo un giorno di stimolazione (sinistra) e dopo 7 giorni di stimolazione (destra).

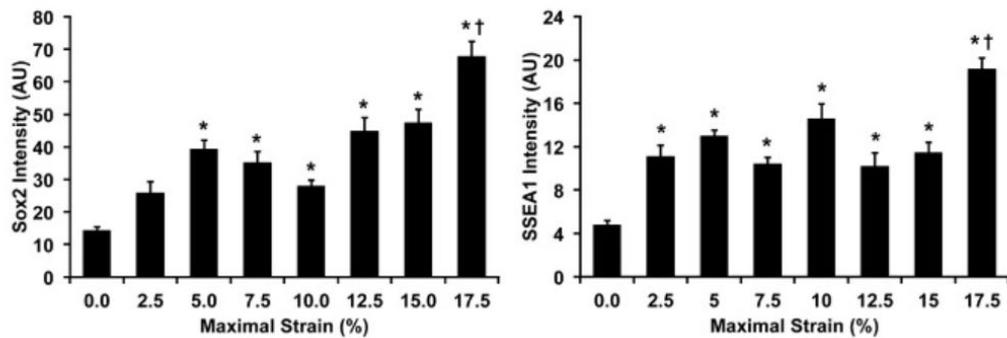


Figura 18. (Lee et al., 2019) Confronto nell'andamento dell'espressione di Sox2 (sinistra) e SSEA1 (destra) in fibroblasti embrionici di topo in funzione dell'intensità di strain entrambi dopo 7 giorni di stimolazione.

Si può quindi evincere come la stimolazione dei fibroblasti di topo espone i migliori effetti sulla riprogrammazione passando attraverso il fattore Oct4, nel caso di sola stimolazione dinamica, aggiungendo che i risultati sono ancora migliori a intensità di stimolo maggiori.

Per la seconda parte si sono combinati stimolazione e alcune molecole di inibitori di chinasi da una lista di laboratorio. Questa fase ha interessato maggiormente il fattore Oct4, che ha subito l'azione di innumerevoli inibitori a piccola molecola sotto la stimolazione ciclica dinamica a diverse forme d'onda, per ricercare il set-up combinato meccanico-chimico ottimale per la sua espressione. Il ruolo degli inibitori di chinasi è quello di contrastare l'effetto bloccante della riprogrammazione delle proteine Rho/ROCK, che aumentano la chinasi – poiché favorite dalla stimolazione ciclica – e costituiscono un ostacolo alla migliore espressione dei fattori target. Per fare ciò è stato messo a pieno regime l'alto grado di produttività del sistema HT-BOSS per applicare più combinazioni stimolo-inibitore alla volta e amplificare le possibilità di risultati favorevoli.

Come riportato anche attraverso i grafici di figura 19, 20 e 21, in condizioni statiche qualsiasi inibitore non ha avuto grandi effetti, e l'azione inibitoria delle chinasi sulla riprogrammazione ha avuto la meglio. Passando alla stimolazione a forma d'onda

sinusoidale non c'è stata alcuna sostanziale differenza fra inibizione e attivazione del fattore, rimanendo in una specie di equilibrio. Mentre i risultati più soddisfacenti sono arrivati dalla stimolazione a onda brachiale, dove gli inibitori di chinasi hanno espresso la maggiore attività nel frenare l'azione delle proteine Rho/ROCK accentuando quindi l'espressione di Oct4 fino a 3.2 volte rispetto ai livelli basali: proprio quello che si stava cercando.

Una sperimentazione simile è stata effettuata anche rispetto ai fattori Sox2 e Nanog, valutandone l'espressione sempre attraverso immunocolorazione. Anche in questi casi l'azione più benefica degli inibitori di chinasi si riscontra con stimolazione ciclica a forma brachiale, ma gli incrementi relativi nell'espressione dei fattori non hanno raggiunto gli stessi livelli di Oct4 (figura 22).

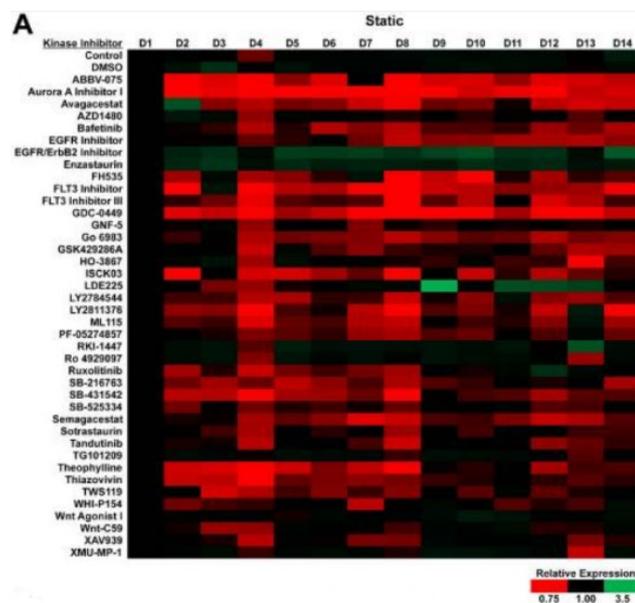


Figura 19. (Lee et al., 2019) Mappa del colore per lo screen meccanobiologico dei fibroblasti di topo con inibitori di chinasi a piccola molecola. Condizioni di stimolazione statiche.

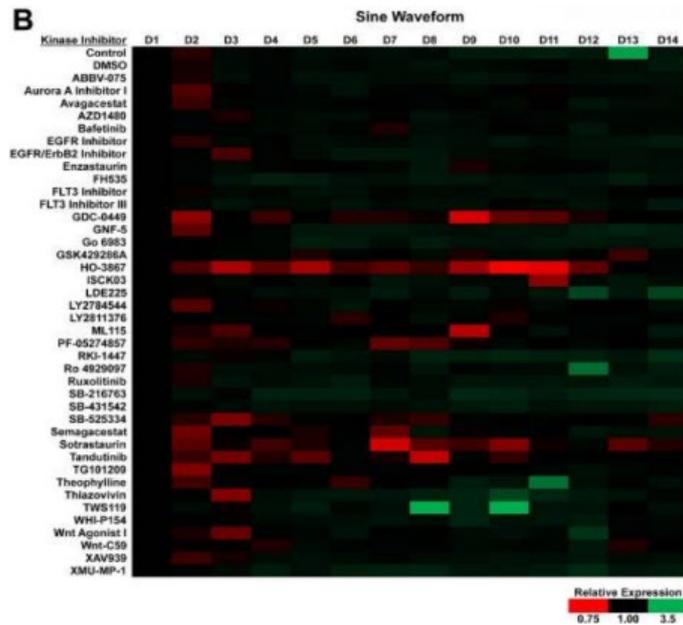


Figura 20. (Lee et al., 2019) Mappa del colore per lo screen meccanobiologico dei fibroblasti di topo con inibitori di chinasi a piccola molecola. Condizioni di stimolazione a onda sinusoidale

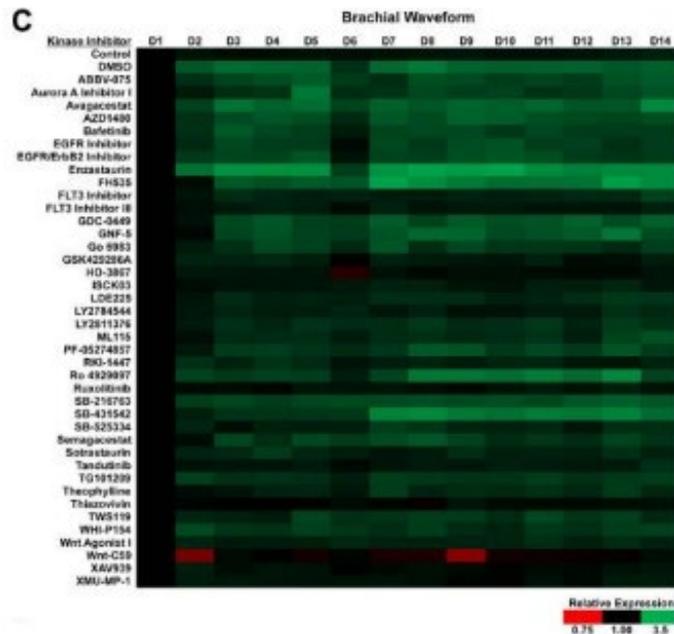


Figura 21. (Lee et al., 2019) Mappa del colore per lo screen meccanobiologico dei fibroblasti di topo con inibitori di chinasi a piccola molecola. Condizioni di stimolazione a onda brachiale.

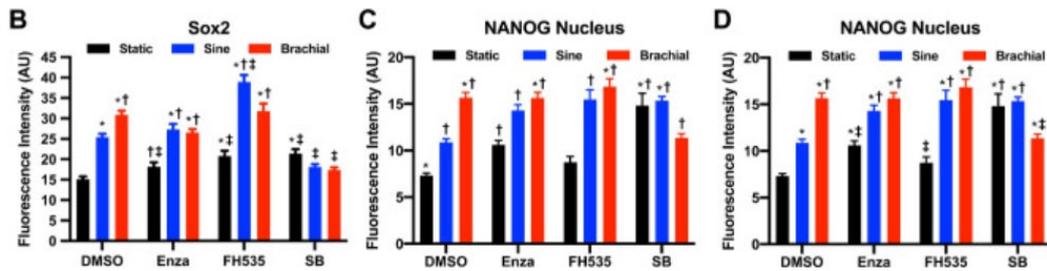


Figura 22. (Lee et al., 2019) Condizioni meccaniche e farmacologiche ottimali per incrementare l'espressione genica dopo 14 giorni con gli inibitori più efficaci risultati dallo screening. (B) Combinazione di condizioni per espressione di Sox2. (C) Combinazione di condizioni per espressione di Nanog nel citoplasma. (D) Combinazione di condizioni per espressione di Nanog nel nucleo.

La meccano-trasduzione si è quindi dimostrata essere di vitale importanza per il perseguimento della riprogrammazione, sia per gli effetti positivi sulla stimolazione netta di alcuni specifici fattori di trascrizione rispetto ad altri, che per l'azione stimolante che in sinergia con inibitori di chinasi accentua ancora di più l'espressione da parte dei nuclei di quegli stessi fattori, promuovendo accelerazioni e amplificazione all'intero processo di induzione della pluripotenza. Ad ogni modo va sottolineato come l'indagine svolta non ha per ora dato risposta all'interrogativo che lega esplicitamente lo stimolo in ingresso all'espressione genica specifica che si osserva.

2.3.2 I biomateriali nel sistema

Nonostante possa sembrare un argomento forse troppo scontato, anche i biomateriali che qui hanno trovato impiego hanno la loro fetta di merito nei risultati ottenuti. Non dobbiamo dimenticare che tutta l'esperienza si basa sul funzionamento del sistema di sollecitazione, il quale quanto meglio funziona, tanto più porterà a risultati positivi a fine test. All'interno della struttura si possono innanzitutto riconoscere due classi di materiali: polimeri e metalli. Non sono infatti presenti componenti in ceramica o compositi, perché a tutti gli effetti non risultano necessari.

Gli elementi metallici costituiscono la maggior parte del sistema: supporto, binari, intelaiatura, piattafornate dei pistoni e viti di fissaggio. La loro proprietà fondamentale

ricade sia all'interno del movimento lineare che dell'affidabilità. I metalli possono infatti essere lavorati superficialmente abbassandone di molto il coefficiente di attrito: questo consente di applicarli per le parti a scorrimento, come i binari; avendo inoltre alta rigidità meccanica e comportamento plastico a carichi elevati, sono di solito preferiti per componenti di supporto statico e intelaiature di strutture. Sono anche facilmente sterilizzabili, cosa che per un sistema di laboratorio impiegato per sofisticate colture cellulari, risulta pressoché indispensabile.

Passiamo alle parti polimeriche: troviamo sia elementi a carattere rigido (pistoni in PTFE/Teflon®) che elastomerico (membrana deformabile in gomma di silicone). I polimeri come visto presentano caratteristiche meccaniche peculiari, ma che, come in questo caso, si adattano alla perfezione alle richieste di progetto, e senza dimenticare che solitamente presentano anche costi più ridotti, per quanto riguarda quelli liberamente accessibili sul mercato. Iniziando dal PTFE, esso ha un modulo elastico molto basso ($0.4 \div 2.5$ GPa) che però gli consente di lavorare bene per i carichi richiesti dal sistema, ma soprattutto ha un coefficiente di attrito fra i più bassi di tutti i materiali conosciuti. Questo è un grande vantaggio in quanto ogni pistone si torva ciclicamente a strofinare contro la membrana deformabile su cui giacciono le cellule; un attrito elevato fra i due materiali genererebbe molti problemi, fra cui usura e dissipazione di calore, che andrebbe a danneggiare la coltura stessa. La gomma di silicone viene invece impiegata in quanto funzionale al ruolo di membrana elastica. Siccome quello che è richiesto a una membrana è proprio quello di deformarsi ma in modo elastico, essa presenta una rigidità estremamente bassa, indi per cui si presta ottimamente allo scopo. La gomma siliconica garantisce prestazioni migliori rispetto alla semplice gomma (classe delle resine polimeriche): risulta ben più resistente alla fatica e all'usura, è molto flessibile e anche resistente alle alte temperature, consentendo sterilizzazione per vapore, ma soprattutto presenta alta biocompatibilità e atossicità, ed essendo la parte a diretto contatto con le cellule, questo è fondamentale.

Altri biomateriali li troviamo in realtà anche nelle piastre di coltura inserite sopra ai pistoni (di cui la membrana fa effettivamente parte). La componente in alluminio

rappresenta assieme a viti, sempre in metallo, l'ancoraggio al piano dell'attuatore; essendo appunto in metallo, ma leggero, garantisce stabilità, rigidità e resistenza. La parte superiore in policarbonato (polimero sintetico) fornisce proprietà quali: bioenergia chimica, alta durabilità, facilità di lavorazione ed elevata resistenza alle alte temperature, il che ne fa un materiale idoneo alla sterilizzazione.

2.3.3 Il sistema bioreattore-attuatore

Concludiamo questa trattazione riprendendo e intercalando nel protocollo anche il terzo argomento principe di questa trattazione. Abbiamo visto come e dove hanno influenza la meccanotrasduzione e i processi bio-fisici e perché anche le proprietà dei materiali impiegati coprono un ruolo altrettanto importante. Ora ci concentriamo sulla funzionalità – dunque sull'importanza sperimentale – dell'impianto messo in piedi dagli operatori. L'intero sistema già sopra descritto nella sezione *Materiali e metodi* rappresenta un'estrema evoluzione di un bioreattore a stimolazione meccanica ciclica. Sono in effetti presenti tutti gli elementi per definirlo in questo modo: le cellule in coltura su un substrato (membrana bidimensionale), il contenitore che definisce lo spazio di coltura (il pozzetto), il terreno di coltura con nutrienti e sostanze necessarie, le condizioni chimico-fisiche e un monitoraggio per mantenerle adatte, e il sistema meccanico di attuazione dello stimolo (HT-BOSS e pistoni). Da sottolineare è il fatto che il dispositivo non è provvisto di perfusione né statica né dinamica: si tratta piuttosto di un bioreattore a *batch* o *fed batch*. Questo elemento è rilevante poiché richiede che l'alimentazione e aggiornamento del terreno di coltura sia fatto manualmente da un operatore, e definisce un possibile limite alle prestazioni della fase di crescita rispetto ad altre tipologie a perfusione. Vero è che un flusso attraverso i pozzetti, che metta in moto continuo il fluido a contatto con le cellule potrebbe avere effetti indesiderati sulla stessa stimolazione meccanica ricercata. Iniziamo considerando il substrato per il mantenimento della coltura durante la sperimentazione: una volta che le cellule devono essere sottoposte alla stimolazione vengono semplicemente trasferite dal terreno precedente a un supporto

bidimensionale definito dalla membrana in gomma siliconica. È stato affrontato nel capitolo iniziale anche l'importanza degli scaffold per il testing su specifiche colture cellulari: in questo caso la disposizione delle cellule non richiede particolari sviluppi su scala tridimensionale in quanto non si stanno ricercando vie per sviluppare specifici tessuti, quindi differenziare cellule verso un fenotipo che richiede particolari forme o rigidità del substrato. La disposizione bidimensionale ottimizza così la superficie a disposizione delle cellule permettendo una sostanziale omogeneità di stimolazione da parte dello stiramento della membrana; se così non fosse si rischierebbe di ottenere una parziale isotropia di sollecitazione, dunque una eterogeneità nella meccanotrasduzione, rendendo i risultati sull'espressione dei fattori di più difficile interpretazione. Questo ci porta alle considerazioni sui fenomeni di stress di taglio sulle cellule, formati quali effetti secondari dallo spostamento della membrana. Infatti, ogni volta che la membrana si stira e si ricontrae, genera uno spostamento del fluido di coltura, e in base alla velocità con cui questo fluido viene spostato (effetto di viscosità idrodinamica) le cellule risentono di *shear stress* il che non è auspicabile; la verifica da parte degli operatori è servita a quantificare questa tensione trasversale per calibrarne i potenziali effetti sulla coltura. La simulazione computazionale ha mostrato che la tensione di taglio media sulla superficie diminuisce in maniera quasi lineare sia con la frequenza di cicli di carico che con la massima deformazione. Ad ogni modo l'ordine di grandezza di sforzo generato è molto ridotto ($0.5 \div 4$ mPa). I risultati della simulazione sono mostrati in figura 24.

Concludendo con un focus sulle potenzialità di stimolazione meccanica dell'attuatore, il motore lineare, assieme al tipo di struttura assemblata permette di ottenere ben tre distinte forme d'onda relativamente complesse ma che rendono unico questo sistema rispetto al panorama nella letteratura attuale, tutto ciò grazie anche alla componente software di controllo che ne costituisce davvero un punto di forza. Il passaggio ulteriore che questo bioreattore ha fatto rispetto alla concorrenza è stato soprattutto garantire una produttività molto più elevata senza incorrere in spiacevoli

compromessi con l'accuratezza, l'affidabilità, le prestazioni dinamiche e l'uniformità degli stimoli applicati.

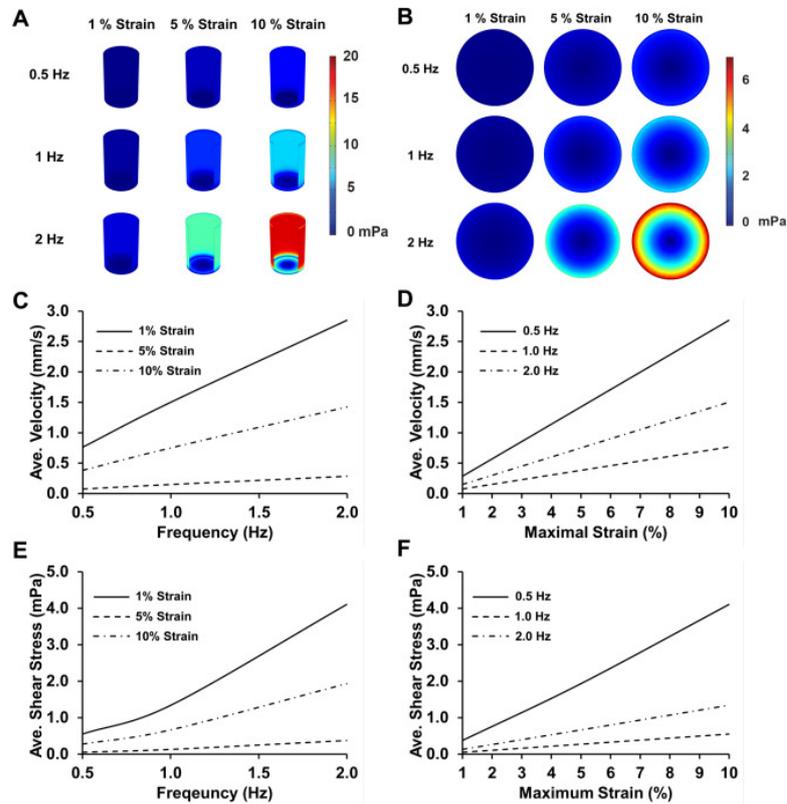


Figura 24. (Lee et al., 2019) Modellazione computazionale del flusso del fluido all'interno dei pozzetti in fase di stimolazione meccanica. (A) Valori di picco dello sforzo di taglio sulle pareti. (B) Valori di picco dello sforzo di taglio sulla superficie inferiore. (C) Velocità media del fluido nel pozzetto in funzione della frequenza di carico. (D) Velocità media del fluido nel pozzetto in funzione del massimo strain. (E) Sforzo di taglio medio sulla coltura in funzione della frequenza di carico. (F) Sforzo di taglio medio sulla coltura in funzione del massimo strain.

2.4 Discussione

Il presente lavoro di revisione ha voluto esporre, attraverso un'analisi letteraria scientifica, le fasi di un protocollo sperimentale di ambito bioingegneristico avanzato. L'esperienza si è svolta nel campo di ricerca della meccanobiologia applicato al settore delle cellule staminali. Si può affermare – a conclusione dell'esposizione di obiettivi, metodi e materiali applicati, risultati e loro discussione – che l'esperienza ha sicuramente portato a enormi benefici per tutto il panorama scientifico di questo ambito.

Si è mostrato come realizzare un sistema per lo screening meccanobiologico dell'espressione genica legata alla riprogrammazione cellulare di fibroblasti di topo: gli operatori hanno implementato un protocollo che va oltre il semplice macchinario e la sua applicazione. Si sono infatti ricercate le condizioni di set-up ottimali tali per cui la stimolazione meccanica fosse in grado di accentuare al massimo delle possibilità l'induzione della pluripotenza, con un'accurata applicazione del metodo scientifico. Sono state effettuate innumerevoli prove, combinando diverse serie di parametri e tipologie di stimolo, supportate ovviamente sia nei tempi che nei costi dalla disponibilità a lavorare con grandi volumi di produzione. Questo ha portato ad ottenere una quantità di dati molto estesa, che opportunamente elaborata e studiata ha portato a individuare le condizioni ottimali. Ma andando oltre al semplice studio meccanobiologico, si è studiata anche l'interazione sinergica fra gli effetti di questo e l'azione di inibitori di chinasi a piccola molecola che, frenando l'attività delle protein-chinasi Rho/ROCK, hanno permesso di incrementare maggiormente il grado di espressione genica di pluripotenza sulle colture stesse. I risultati sono stati sicuramente soddisfacenti: basti considerare che nel complesso il fattore di trascrizione di più rilevanza per il processo (Oct4) ha permesso di ottenere un grado di pluripotenza fino a 3.5 volte maggiore rispetto alle condizioni di partenza.

L'importanza che questo studio riveste è definita dal fatto che, come riconoscono gli stessi autori, ha permesso di dimostrare l'abilità eccellente che la combinazione di

condizioni meccaniche/farmacologiche ha di indurre una riprogrammazione di cellule somatiche completa, e di fare tutto ciò in assenza di modificazione genetica sulle stesse. Sì, perché i risvolti genetici che si osservano provengono tutti da processi fisiologici in risposta a specifiche stimolazioni *esterne* alla cellula. Non è stato assolutamente intaccato in modo artificiale il patrimonio genetico di partenza. Questo fattore rappresenta forse l'elemento più positivo a conclusione dell'esperienza effettuata, in quanto molte tradizionali tecnologie di riprogrammazione prevedono proprio che il DNA delle cellule iniziali venga manipolato, e i rischi di questa modalità sono elevati: un minimo errore nel processo può portare mutazioni e tumogenicità nelle linee successive, con l'insorgere di problemi sia di tempo che di costi. Il protocollo esaminato pone quindi solide fondamenta per sviluppare la ricerca a supporto delle terapie a base cellulare, dello screening farmacologico, dell'investigazione sui tumori e altre patologie gravi. In aggiunta, questo sistema ha permesso di fare molta più chiarezza sul ruolo che le stimolazioni fisiche hanno rispetto alla pluripotenza, per cui attraverso gli inibitori a piccola molecola si è capito come e quando le condizioni portano a una sua inibizione, oppure a una sua accentuazione.

Nella pratica dei fatti, lo sviluppo che la ricerca sulle staminali che sfruttano cellule somatiche di topo, cui questa esperienza fa fare grandi passi in avanti, rappresenta sicuramente un modo per abbattere quei continui problemi etici e morali che affliggono le indagini su cellule staminali (embrionali e non) di tipo umano. Tutto ciò grazie all'incredibile somiglianza che esiste fra le nostre cellule e quelle di topo comune. Come è stato già più volte sottolineato, ulteriori implicazioni pratiche future saranno sicuramente nel supporto alla crescita della medicina rigenerativa, permettendo di abbassare i costi e i tempi, e di amplificare sempre di più volumi di lavorazione.

Una difficoltà riscontrata in questo lavoro è stata soprattutto il fatto che in letteratura sono ancora pochi gli esempi di esperienze in linea con questo tipo di tecnologia. Il pregio del protocollo e della strumentazione in esame è infatti quello di essere all'avanguardia sotto tutti gli aspetti, ma dall'altro lato rappresentano in un certo

senso la linea di frontiera di questo campo, che dovrà aspettare affinché la ricerca lo approfondisca. Ciononostante, si è potuto osservare che il punto cui si è arrivati con tale tecnologia è stato raggiunto grazie alla raccolta – e alla loro ottimale integrazione – di tanti strumenti, teorici e non, già a disposizione da tempo nel panorama ingegneristico e biotecnologico. Bisogna infatti constatare che la letteratura è davvero ben fornita di articoli sulla meccanobiologia, sui biomateriali, sui bioreattori e ingegneria tissutale, e in maniera più ridotta anche su dispositivi di stimolazione cellulare. Molto ridotti sono invece quelli su precisi protocolli con cui queste tecnologie interagiscono per studi sulle staminali. La consultazione delle fonti relative a questo panorama ha permesso perciò di apprendere le basi da cui si partiva per capire dove effettivamente si è arrivati, ma anche verso dove si può proseguire.

Come si accennava poco sopra, all'interno dell'articolo non sono assenti alcuni elementi che lasciano interrogativi e altri che comprendono passaggi non del tutto chiari.

Primo fra tutti, un concetto che gli operatori stessi hanno individuato come probabile limite al loro protocollo. Riguarda l'uso della immunocoloazione (immunofluorescenza) come tecnica di controllo dell'espressione genica nelle cellule stimulate. Questa modalità si basa sul legame antigene-anticorpo, allo scopo di verificare se la proteina di ruolo antigene sia presente o meno, e in che quantità, all'interno del campione. Non è fra le tecniche più efficaci, eppure nello specifico caso in esame, si è constatato che ha agito senza ripercussioni sui risultati. Si interfaccia infatti molto bene con i metodi standard di screening cellulare e permette una valutazione ottimale della risposta a livello delle singole cellule.

Un altro punto che ha lasciato qualche interrogativo è la scelta di depositare le cellule in coltura direttamente e soltanto sulla membrana in gomma di silicone. In ingegneria dei tessuti, così con in molti degli articoli presi da esempio (Brown, 2000 in primis), si è soliti sfruttare strutture di supporto alle colture cellulari predisposte a sollecitazione meccanica ciclica che possano incrementare le condizioni di vita e di interazione cellule-ambiente, fra cui ricadono: l'accesso delle cellule ai nutrienti, la

distribuzione dello stress su tre dimensioni e la migliore aderenza delle cellule alla struttura, grazie a pori e rugosità. Inerente alla scelta del supporto cellulare c'è anche un'altra questione, che riguarda l'alimentazione delle colture: è vero che generare un flusso di perfusione ciclico e continuo fra i pozzetti avrebbe potuto intaccare lo sviluppo dello stimolo desiderato fra membrana e cellule, ma si sarebbe potuto testare almeno per verificare effettivamente quali effetti negativi sarebbero potuti insorgere; questo allo scopo di rendere il mantenimento della coltura operatore-indipendente. Infine, un ultimo dubbio che l'articolo ha lasciato, riguarda la verifica del grado di pluripotenza raggiunto dalle cellule. Senza nulla togliere ai metodi applicati, un alturiero spunto di analisi avrebbe potuto esser stato la prova di fare ridifferenziare le cellule ottenute in altri tipi di tessuto, per testare se in questo step in più si fossero riscontrati problemi legati alla trascrizione genetica da fase staminale pluripotente a cellula specializzata.

Il futuro avanzamento di questo studio può proseguire su innumerevoli vie, così come può esso stesso fungere da base per ulteriori lavori e ricerche che ancora aspettano di essere verificate. Sarebbe interessante innanzitutto poter sviluppare il macchinario per amplificare le possibilità di stimolo e raccolta dati che per ora è in grado di sostenere, per esempio con nuovi e diversi tipi di stimolazione – non solo da stiramento della membrana – oppure con nuove tipologie di substrato e di disposizione delle cellule. Questa strada potrebbe inoltre portare all'approfondimento delle conoscenze in campo meccanobiologico, e colmare quei divari nel paradigma della segnalazione che ancora sono incompiuti, ad esempio continuando ad indagare sul ruolo dei fattori di trascrizione impiegati, su come esprimerli al meglio, e su come sfruttarli per prolungare e migliorare il grado di pluripotenza ottenuto.

2.5 Conclusioni

Dell'articolo è stata apprezzata la chiarezza formale nel descrivere gli obiettivi e il processo di indagine, nonostante qualche punto interrogativo ripreso in precedenza. Il materiale a suo supporto (compresi gli articoli citati) è sicuramente ampio e ricco di nozioni valide che garantiscono una buona base allo studio condotto. In particolare, è bene sottolineare che per la stessa argomentazione di questo elaborato rispetto a quello in esame, diversi articoli fra le sue referenze sono stati consultati, e opportunamente citati.

Personalmente lavorare su questo progetto mi ha arricchito molto, sia dal punto di vista nozionistico, su ambiti tecnico-scientifici che difficilmente avrei approfondito in questo modo in altre circostanze, che dal punto di vista metodologico. Ho infatti sperimentato cosa significhi concentrarsi su un lavoro in modo personale e costruire da zero, coi propri mezzi e le proprie capacità, qualcosa che all'inizio era solo un'intenzione. Leggere articoli scientifici, cercare fonti e confrontarle per stabilirne autenticità ma anche utilità, riprendere in mano appunti di vecchie materie che si sono rivelati di grande supporto: sono tutti mattoni che ho messo assieme in queste settimane di lavoro per arrivare a questo elaborato, di cui mi sento soddisfatto. Farò tesoro di questa esperienza, sperando che tutto ciò che ho assimilato possa allo stesso modo risultarmi d'aiuto negli anni di studio a venire.

Ringraziamenti

La conclusione di questo elaborato sancisce per me il raggiungimento di uno degli obiettivi più importanti, per ora, nella mia vita. Non rappresenta assolutamente un punto di arrivo, quanto piuttosto un punto di passaggio che corona anni di studio e lavoro. Vorrei ringraziare i miei amici, e i miei famigliari per la solidarietà che hanno sempre dimostrato, mia sorella e i miei genitori, che hanno sempre dimostrato pieno appoggio in quello che faccio, ma che hanno anche saputo essere una spalla fondamentale nei momenti più difficili che hanno accompagnato questo mio percorso, non privo di salite o cadute.

Vorrei ringraziare enormemente anche le mie nonne, Virginia e Marlene, cui vorrei dedicare questo lavoro, per il bene che voglio loro.

Infine, un grazie dedicato anche a me, per non essermi mai arreso, per aver raggiunto obiettivi che mi sembravano troppo difficili, e per aver imparato a lavorare con costanza e determinazione attraverso periodi difficili cui ho dovuto convivere.

Bibliografia

- **Alexander, J. H.** (2016). Mechanical property improvement of carbon fiber reinforced polymeric composites by filler dispersion: a review. *Journal of the Mississippi Academy of Sciences*, 61(3), 242-249.
- **Banes, A. J., Gilbert, J., Taylor, D., & Monbureau, O. L. I. V. I. E. R.** (1985). A new vacuum-operated stress-providing instrument that applies static or variable duration cyclic tension or compression to cells in vitro. *Journal of cell science*, 75(1), 35-42.
- **Blitterswijk, C. V., De, B. J., Hubbell, J. A., Debruijn, J. D., Lindahl, A., Sohler, J., Cancedda, R., Hubbell, J., Blitterswijk, C. V., & de, B. J.** (2014). *Tissue engineering*, Elsevier Science & Technology, San Diego
- **Brambrink, T., Foreman, R., Welstead, G. G., Lengner, C. J., Wernig, M., Suh, H., & Jaenisch, R.** (2008). Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. *Cell stem cell*, 2(2), 151–159. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.01.004>
- **Brown T. D.** (2000). Techniques for mechanical stimulation of cells in vitro: a review. *Journal of biomechanics*, 33(1), 3–14. [https://doi.org/10.1016/s0021-9290\(99\)00177-3](https://doi.org/10.1016/s0021-9290(99)00177-3)
- **Cancedda, R., Pietrabissa, R.,** (2002). *Ingegneria dei tessuti biologici*, Gruppo nazionale di Bioingegneria, Patron Editore, Bologna
- **Fuller, B. G.** (1961). Tensegrity. *Portfolio Artnews Annual* 4, 112-127
- **Hasegawa, S., Sato, S., Saito, S., Suzuki, Y., & Brunette, D. M.** (1985). Mechanical stretching increases the number of cultured bone cells synthesizing DNA and alters their pattern of protein synthesis. *Calcified tissue international*, 37(4), 431-436.
- **Hung, C. T., & Williams, J. L.** (1994). A method for inducing equi-biaxial and uniform strains in elastomeric membranes used as cell substrates. *Journal of biomechanics*, 27(2), 227-232.

- **Ingber, D. E.** (2003). Tensegrity I. Cell structure and hierarchical systems biology. *Journal of cell science*, *116*(Pt 7), 1157–1173.
<https://doi.org/10.1242/jcs.00359>
- **Ingber, D. E.** (2008). Tensegrity and mechanotransduction. *Journal of bodywork and movement therapies*, *12*(3), 198–200.
<https://doi.org/10.1016/j.jbmt.2008.04.038>
- **Iyer, K. V., Pulford, S., Mogilner, A., & Shivashankar, G. V.** (2012). Mechanical activation of cells induces chromatin remodeling preceding MKL nuclear transport. *Biophysical journal*, *103*(7), 1416–1428.
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.08.041>
- **Jansen, K. A., Donato, D. M., Balcioglu, H. E., Schmidt, T., Danen, E. H., & Koenderink, G. H.** (2015). A guide to mechanobiology: Where biology and physics meet. *Biochimica et biophysica acta*, *1853*(11 Pt B), 3043–3052. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.05.007>
- **Lee, D. A., Knight, M. M., Campbell, J. J., & Bader, D. L.** (2011). Stem cell mechanobiology. *Journal of cellular biochemistry*, *112*(1), 1-9.
- **Lee, J., Armenta Ochoa, M., Maceda, P., Yoon, E., Samarneh, L., Wong, M., & Baker, A. B.** (2020). A high throughput screening system for studying the effects of applied mechanical forces on reprogramming factor expression. *Scientific reports*, *10*(1), 15469. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72158-5>
- **MacQueen, L., Sun, Y., & Simmons, C. A.** (2013). Mesenchymal stem cell mechanobiology and emerging experimental platforms. *Journal of the Royal Society, Interface*, *10*(84), 20130179.
<https://doi.org/10.1098/rsif.2013.0179>
- **Macrí-Pellizzeri, L., Pelacho, B., Sancho, A., Iglesias-García, O., Simón-Yarza, A. M., Soriano-Navarro, M., González-Granero, S., García-Verdugo, J. M., De-Juan-Pardo, E. M., & Prosper, F.** (2015). Substrate stiffness and composition specifically direct differentiation of

induced pluripotent stem cells. *Tissue engineering. Part A*, 21(9-10), 1633–1641. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2014.0251>

- **Manzoni, M.**, (2008). Microbiologia industriale, *Enciclopedia della scienza e della tecnica (2008)*
- **McNamara, L. E., Burchmore, R., Riehle, M. O., Herzyk, P., Biggs, M. J., Wilkinson, C. D., Curtis, A. S., & Dalby, M. J.** (2012). The role of microtopography in cellular mechanotransduction. *Biomaterials*, 33(10), 2835–2847. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.11.047>
- **Moslemi Petrucci, A., Vahedi, K., Rahmani, M., & Moslemi Petrucci, M.** (2020). Numerical and analytical simulation of ballistic projectile penetration due to high velocity impact on ceramic target. *Frattura Ed Integrità Strutturale*, 14(54), 226–248. <https://doi.org/10.3221/IGF-ESIS.54.17>
- **Navarra, P., Dapavo, P., Creazzola, S.** (2019) Small molecules. Il potenziale di una nuova classe di farmaci, supplemento al n. 3 di *Popular Science*, Roma, Sics srl
- **Ong, K. L., Lovald, S., Black, J.** (2017). Orthopaedic Biomaterials in Research and Practice, CRC Press, Boca Raton (Florida)
- **Petrabissa, R.** (1996). Biomateriali per protesi e organi artificiali, Patron Editore, Bologna
- **Schaffer, J. L., Rizen, M., L'Italien, G. J., Benbrahim, A., Megerman, J., Gerstenfeld, L. C., & Gray, M. L.** (1994). Device for the application of a dynamic biaxially uniform and isotropic strain to a flexible cell culture membrane. *Journal of Orthopaedic Research*, 12(5), 709-719.
- **Stamenović, D., & Ingber, D. E.** (2009). Tensegrity-guided self assembly: from molecules to living cells. *Soft Matter*, 5(6), 1137-1145
- **Takahashi K, Yamanaka, S.** (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126: 663–676. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

- **Tandon, N., Marolt, D., Cimetta, E., & Vunjak-Novakovic, G.** (2013). Bioreactor engineering of stem cell environments. *Biotechnology advances*, 31(7), 1020–1031. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.03.007>
- **Teramura, T., Takehara, T., Onodera, Y., Nakagawa, K., Hamanishi, C., & Fukuda, K.** (2012). Mechanical stimulation of cyclic tensile strain induces reduction of pluripotent related gene expressions via activation of Rho/ROCK and subsequent decreasing of AKT phosphorylation in human induced pluripotent stem cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 417(2), 836–841. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.12.052>

Sitografia

- Figura 6: <http://www-materials.eng.cam.ac.uk/mpsite/properties/default.html>
- Figura 9: <https://polymerdatabase.com/polymer%20physics/Stress-Strain%20Behavior.html>
- Figura 13: [https://virtuale.unibo.it/pluginfile.php/535191/mod_resource/content/2/Sezione%202%20-%20propr meccaniche biomateriali.pdf](https://virtuale.unibo.it/pluginfile.php/535191/mod_resource/content/2/Sezione%202%20-%20propr%20meccaniche%20biomateriali.pdf)