

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

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN INGEGNERIA BIOMEDICA

TITOLO DELLA TESI

Realizzazione di una piattaforma di coltura in perfusione
per l'induzione del fenotipo cellulare.

Tesi in

Fondamenti di Ingegneria dei Tessuti Biologici

Relatore

Emanuele Domenico Giordano

Correlatore

Joseph Lovecchio

Presentata da

Claudio Forlivesi

Anno Accademico 2021/2022

Sommario

Abstract.....	4
1. Supporti di coltura.....	5
1.1 Bioreattori.....	5
1.1.1 Bioreattori a meccano-trasduzione	6
1.1.2 <i>Bioreattori Spinner flask</i>	6
1.1.3 Bioreattori rotating wall vessel (rotazionali)	7
1.1.4 Bioreattori a piattaforma basculante.....	8
1.1.5 Bioreattori a perfusione	9
2. Apparato digerente.....	11
2.1 Cenni di anatomia funzionale.....	11
2.2 La mucosa dell'intestino tenue.....	14
2.2.1 Trasporto e assorbimento intestinale	14
2.2.2 Secrezione intestinale	17
2.2.3 Differenziamento e staminalità dell'epitelio.	18
2.3 Patologie del sistema digerente	20
2.4 Modelli di assorbimento intestinale	26
2.5 Cellule Caco-2.....	34
2.5.1 Condizioni di coltura standard.....	35
2.5.2 Transwell	36
2.5.3 TEER	38
2.5.4 Assays molecolari.....	41
2.5.5 Supporti di coltura 3D e dinamici per Caco-2.....	43
2.5.6 Limitazioni delle cellule Caco-2.....	64
3. Tessuto osseo	68
3.1 Anatomia e funzioni	68
3.2 Cellule osee	70
3.3 Rimodellamento osseo	71
3.4 Patologie ossee	72
3.5 Modelli osteogenici.....	74

3.6. Cellule MC3T3-E1	76
3.6.1 Assays osteogenici.....	78
3.6.2 Supporti di coltura 3D e dinamici per MC3T3-E1	79
4. Studio sperimentale.....	91
4.1 Introduzione	91
4.2 Materiali e metodi	92
4.2.1 Bioreattore	92
4.2.2 Interfaccia grafica	98
4.2.3 Linee cellulari	99
4.2.4 Caratterizzazione del flusso.....	99
4.2.5 Microscopia	100
4.2.6 Studio della morfologia cellulare	100
4.3 Risultati e discussione	101
4.3.1 Test dei componenti.....	101
4.3.2 Studio MC3T3	102
4.3.2.1 Test di biocompatibilità	102
4.3.2.2 Studio della morfologia.....	104
4.3.2.3 Studio dell'eccentricità	111
4.3.3 Confronto MC3T3-E1 vs. Caco-2	112
4.4 Analisi dei costi di produzione.....	116
4.5 Conclusioni e prospettive future	117
Bibliografia:	120

Abstract

I modelli *in vitro* sono, ad oggi, fra i più sfruttati nel campo della ricerca. Tuttavia, le piattaforme che ne supportano lo sviluppo, sono spesso inadeguate a riprodurre fedelmente la complessa morfologia, interconnessione e dinamicità dell'ambiente biologico che intendono simulare. Alcune delle caratteristiche salienti dell'organismo umano sono: la struttura tridimensionale dei tessuti, la presenza di stimoli meccanici di deformazione e lo scorrimento dei diversi fluidi corporei. Allo scopo di riprodurre quest'ultimo aspetto di centrale importanza, in questo lavoro di tesi è stato progettato e costruito un bioreattore a perfusione, in grado di applicare un flusso di medium su linee cellulari di diversa natura. Attraverso l'osservazione del loro comportamento in regime perfusivo, sarà poi possibile effettuare una comparazione con quello di coltivazioni statiche tradizionali. Sono state selezionate, a questo scopo, cellule facenti parte di due linee continue: le Caco-2 e le MC3T3-E1. Gli apparati che si è deciso di rappresentare, ovvero quello intestinale e quello osseo, sono fra loro molto differenti, ma entrambi caratterizzati dalla presenza, *in vivo*, di flussi di varia natura. Ciò permetterà di estrapolare risultati ad ampio spettro rispetto ai potenziali benefici di una coltura dinamica, fra i quali ci si attende una capacità proliferativa maggiore e una morfologia cellulare più rappresentativa, dovuti al maggior ricircolo di nutrienti, alla rimozione di scarti metabolici potenzialmente tossici e allo stress di taglio fornito alle cellule.

1. Supporti di coltura

Per lungo tempo sono state sfruttate strategie di coltura statiche, incapaci di fornire gli stimoli necessari alla simulazione dell'ambiente *in vivo*, portando allo sviluppo di modelli incompleti i cui risultati erano scarsamente correlabili a quelli ottenuti sul campo.

In particolare, a causa della mancanza di un ricircolo continuo ed efficiente del terreno di coltura a disposizione delle cellule, si notano zone che presentano differenti concentrazioni di ossigeno e nutrienti. Ciò provoca una proliferazione cellulare maggiore nella periferia del campione biologico tridimensionale, mentre il centro non è raggiunto da una quantità adeguata di sostanze nutritive, andando incontro ad un processo di necrosi. *In vivo* è la fitta rete di capillari che permette la perfusione sanguigna anche negli strati più profondi dei tessuti mentre, *in vitro*, tale elemento viene a mancare. Lo sviluppo di un flusso di terreno di coltura (o di un suo rimescolamento) permette di ovviare a questa problematica, fornisce un mezzo per la rimozione degli scarti metabolici cellulari che potrebbero accumularsi in zone stagnanti e provvede a sottoporre le cellule ad uno stress di taglio che simuli quello fisiologicamente dovuto allo scorrimento del sangue o di altri fluidi. La generazione di tale ambiente dinamico è permessa dai bioreattori, ai quali si affianca l'utilizzo degli scaffold. [1] [2]

Questi ultimi sono definiti come strutture tridimensionali solide, costituite di biomateriale (nella maggior parte dei casi polimerico, di origine naturale o sintetica), che presentano una struttura porosa sulla quale possono essere seminate le cellule da porre in coltura. Modulando e selezionando le proprietà meccaniche (rigidezza, elasticità, durezza), morfologiche (porosità, interconnessione fra i pori, topografia superficiali) e chimiche (dalle quali dipendono biocompatibilità, bioattività tasso di degradazione) di questi supporti, è possibile riprodurre fedelmente la matrice extracellulare (ECM) nativa. [3] [4]

1.1 Bioreattori

I bioreattori sono dispositivi ingegnerizzati per generare, in modo riproducibile, un ambiente dinamico finemente controllato, con l'obiettivo di incentivare la vitalità, guidare il processo di differenziamento e modulare le vie metaboliche delle cellule in coltura. Per ottenere tale risultato vengono sfruttati diversi metodi di attuazione, in grado di generare uno spostamento reciproco fra le cellule e il terreno di coltura o di deformare il supporto su cui sono ancorate le cellule stesse. I bioreattori più utilizzati sono: a mecano-trasduzione, spinner flask, rotating wall vessel, a piattaforma basculante e a perfusione.

1.1.1 Bioreattori a meccano-trasduzione

Incorporano un'unità motorizzata attraverso la quale verranno messe in movimento parti del dispositivo che, a loro volta, eserciteranno una sollecitazione pressoria (sia questa di compressione, trazione, torsione o flessione) sul campione cellulare. L'intensità della forza può essere modulata in base all'esperimento e al tessuto in esame, adattando anche il pattern di applicazione, che può comprendere sollecitazioni cicliche, statiche o di intensità incrementale nel tempo.

I mezzi con i quali è trasmessa la tensione meccanica possono essere di vario genere come, ad esempio, pistoni in grado di comprimere volumi di terreno di coltura in cui sono immersi gli scaffold su cui sono alloggiate le cellule (o direttamente gli scaffold stessi, se si vogliono testarne le proprietà meccaniche), o ganasce mobili all'interno delle quali è fissato il campione. Questa tipologia di bioreattori si presta bene allo studio del comportamento di popolazioni cellulari sottoposte nativamente a sollecitazioni cicliche, come quelle residenti nell'apparato scheletrico o le cellule intestinali, deformate dalle contrazioni peristaltiche. [1]

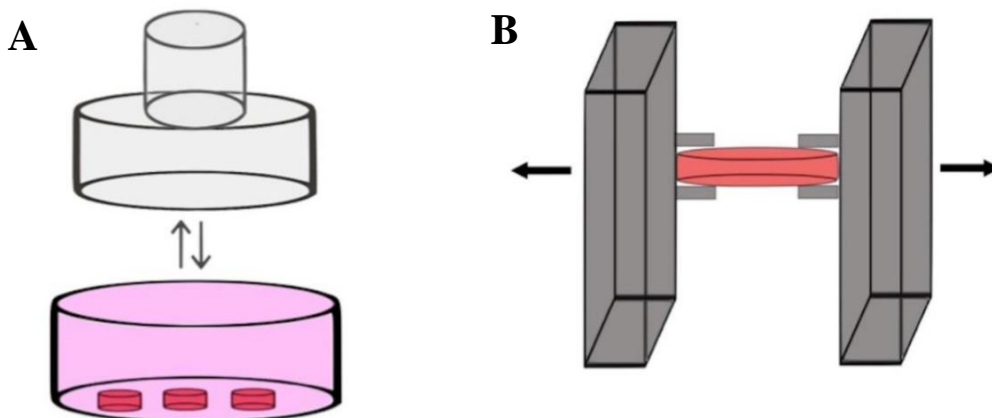


Figura 1 Bioreattori a meccano-trasduzione che sfruttano metodi diversi per applicare una forza al campione di tessuto o agli scaffold. (A) Una pressa meccanica in grado di comprimere la massa di media (rosa) nella quale sono immersi gli scaffold o i tessuti, sui quali si propaga lo sforzo. (B) Il campione viene fissato alle ganasce ed è sottoposto a trazione, compressione o sforzo ciclico in base al movimento dei bracci paralleli del dispositivo.

1.1.2 Bioreattori Spinner flask

Sfruttano il flusso convettivo prodotto da un elemento agitatore magnetico, posto in rotazione all'interno di un contenitore cilindrico in vetro contenente il terreno di coltura. La forza idrodinamica così prodotta permetterà al terreno di coltura di penetrare all'interno delle porosità degli scaffold seminati di cellule e fissati all'interno del bioreattore. L'efficace trasporto dei nutrienti e la rimozione dei prodotti tossici, ottenibile con tali dispositivi, hanno dimostrato un beneficio nella distribuzione

delle cellule sui supporti e un'aumentata attività di differenziamento: fattori che rendono questi dispositivi particolarmente adatti ad applicazioni in campo osteogenico. La generazione di eccessive turbolenze, tuttavia, potrebbe causare danni alla vitalità cellulare sulla superficie dei supporti.

I bioreattori Spinner Flask sono provvisti di un inlet e un outlet per il riempimento e la rimozione del terreno. La presenza dei condotti in comunicazione con l'esterno permette di portare avanti la coltura in modalità continua: durante la fase di crescita cellulare porzioni di terreno di coltura esausto vengono rimosse e sostituite con le stesse quantità di terreno di coltura fresco. La modalità batch, invece, non prevede alcun ricambio del terreno di coltura che, una volta privo di nutrienti e

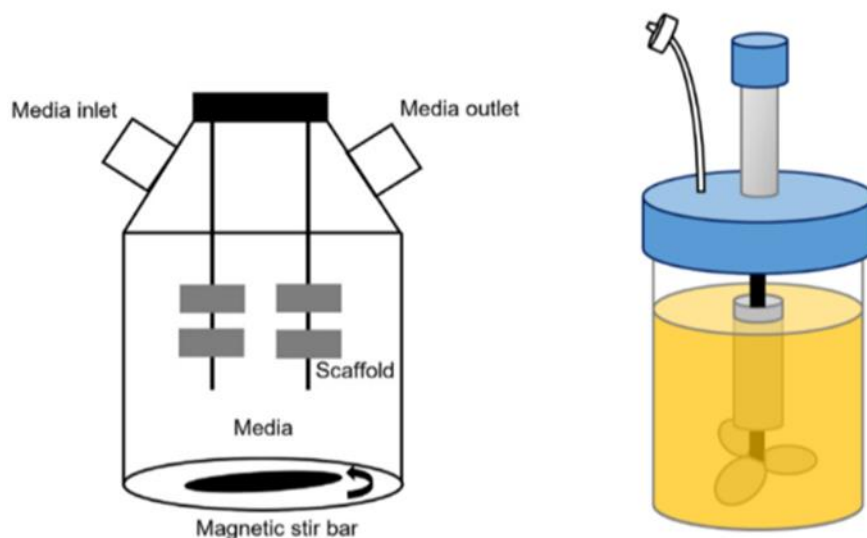


Figura 2 Rappresentazioni schematiche di bioreattori spinner flask

saturo di sostanze di scarto, non permetterà più la crescita cellulare fornendo, però, un completo isolamento del sistema nei confronti di possibili infezioni. La modalità fed-batch, prevede l'aggiunta continua di terreno di coltura fresco, ma senza la rimozione di quello esausto. [2] [5]

1.1.3 Bioreattori rotating wall vessel (rotazionali)

Sono dispositivi formati da due cilindrici concentrici, il più esterno dei quali è posto in rotazione (normalmente da 20 a 40 rpm) attorno al proprio asse orizzontale generando un flusso convettivo costante, mentre quello interno è statico e permette lo scambio di gas. Le particolarità che li contraddistinguono sono: la possibilità controllare l'ossigenazione (non attuabile nei bioreattori spinning flask) e il basso livello di stress di taglio che imprimono sui campioni cellulari. Questi ultimi, grazie al movimento dinamico del fluido sono mantenuti in uno stato di sospensione (se la velocità di rotazione è adeguata), per cui non necessitano di dispositivi di ancoraggio. L'applicazione dei bioreattori rotazionali è maggiormente indicata per la coltivazione di cellule e tessuti privi di scaffold,

in modo che siano liberi di formare aggregati in base alla loro propensione nativa, formando strutture 3D fisiologicamente accurate. Anche campioni di tessuti ex vivo sono stati coltivati all'interno di questa tipologia di bioreattore, incrementando il periodo in cui hanno mantenuto la loro vitalità. Tuttavia, occorre prestare attenzione allo spessore dei campioni prelevati poiché, se troppo spessi, la perfusione del terreno di coltura non raggiungerà gli strati più profondi. Inoltre, la presenza all'interno del cilindro rotante di strutture solide come gli scaffold potrebbe portare a continui urti degli stessi contro le pareti: possibile causa di danno alle cellule e della formazione di turbolenze che provocherebbero una mal distribuzione dei nutrienti.

Uno ulteriore svantaggio di questa tipologia di dispositivo è la grande quantità necessaria di terreno di coltura per effettuare il riempimento del cilindro, oltre all'esigenza di effettuare un cambio dello stesso ogni 3-7 giorni. Pochi casi sono documentati in cui il sistema sia stato dotato di un circuito automatizzato per il rimpiazzo del terreno di coltura che, secondo la procedura standard, deve essere effettuato manualmente.

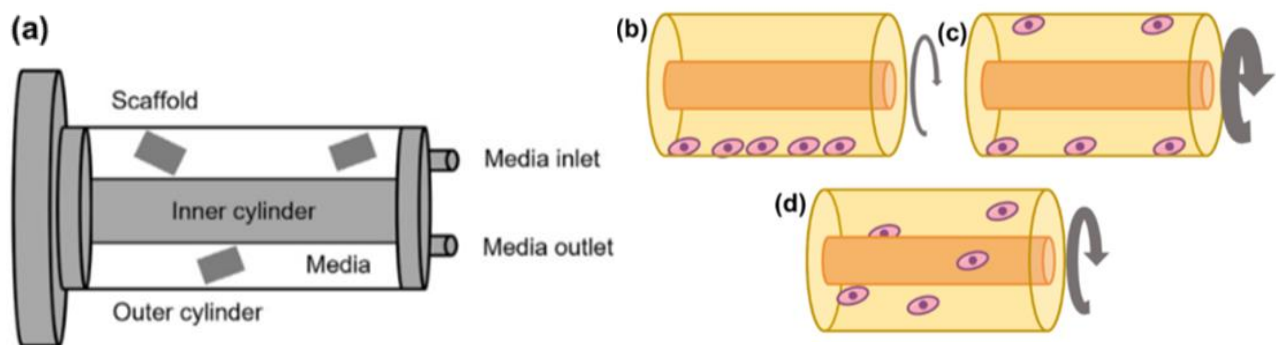


Figura 3 (a) Schema di un bioreattore rotazionale. A velocità di rotazione differenti i tessuti (o gli scaffold) immersi nel media, seguiranno traiettorie differenti. A bassa velocità (b) si posizioneranno sul fondo del cilindro esterno, a velocità alta (c) prevarrà la forza centrifuga e saranno premuti contro le pareti. A velocità adeguata (d) rimarranno in uno stato di sospensione all'interno del fluido di coltura.

1.1.4 Bioreattori a piattaforma basculante

Questa tipologia di bioreattore prevede il riempimento di una sacca flessibile con il terreno di coltura, nel quale saranno immersi i campioni. La piattaforma basculante sulla quale è fissata la sacca provvederà, attraverso un movimento oscillatorio, a generare il rimescolamento del fluido e di conseguenza, la perfusione dei tessuti.

La formazione di onde in corrispondenza dell'interfaccia aria-liquido all'interno della sacca, inoltre, permetterà un elevato trasferimento di massa evitando, allo stesso tempo, la deposizione di particelle e la generazione di uno stress di taglio eccessivo.

Uno dei fattori da tenere in considerazione nell'utilizzo di questo tipo di bioreattore è la velocità di agitazione. Infatti, se ad una maggiore velocità di agitazione corrisponde, nella maggior parte di casi, un aumentato stress di taglio, alcune frequenze specifiche di oscillazione possono causare vorticosità potenzialmente in grado di danneggiare meccanicamente i tessuti. Tale frequenza, detta di risonanza deve, perciò, essere preventivamente stimata per evitare di sottoporre i campioni a stress indesiderati.

Un'altra problematica di questi dispositivi è la propensione di alcuni materiali con cui vengono costruite le sacche (se non precedentemente trattate), ad attrarre e trattenere molecole e particelle.

I bioreattori a piattaforma basculante sono stati, inizialmente, ideati per affiancare gli spinner flask nella coltivazione di cellule animali per la produzione di proteine ricombinanti tuttavia, in seguito, hanno ottenuto un buon successo anche nella coltura di cellule dal potenziale osteogenico come le cellule mesenchimali umane (hMSC) e di cellule sanguigne. [1] [5]

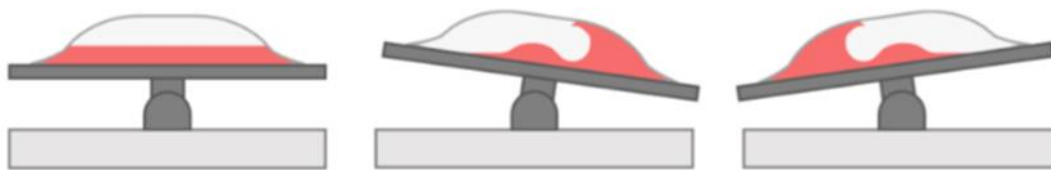


Figura 4 Schema del movimento oscillante attorno al fulcro della piattaforma del bioreattore. La movimentazione del terreno di coltura genererà onde in grado di assicurare un efficace rimescolamento.

1.1.5 Bioreattori a perfusione

I bioreattori a perfusione sono la tipologia più sfruttata e prevedono l'utilizzo di pompe (principalmente peristaltiche o a siringa) per generare il flusso che verrà fatto passare attraverso gli scaffold porosi o sulla loro superficie, entrando in contatto con il materiale cellulare. In base alle loro dimensioni e alla quantità di terreno di coltura necessario, possono essere suddivisi in sistemi millifluidici o microfluidici. I primi sono caratterizzati da camere di coltura o canali fluidici dalle dimensioni che vanno da 1 a 10 mm e contengono un volume di fluido che va da 1 a 100 ml. Il terreno di coltura può essere fatto ricircolare in modo continuo all'interno del percorso fluidico del quale fanno parte, nella maggioranza dei casi, le pompe, i reservoir e le tubazioni che collegano i vari elementi. Una seconda opzione è quella di optare per un singolo passaggio del terreno di coltura, che verrà

raccolto a livello dell'outlet. Il regime imposto al flusso può essere costante o pulsatile e la portata può essere facilmente modulata in base alle porosità presentate dallo scaffold e alla tipologia di cellule in coltura.

I risultati ottenuti con questo tipo di bioreattore vanno da un' aumentata vitalità cellulare ad uno sviluppo più rapido del fenotipo differenziato dei tessuti. Diversi studi hanno documentato l'efficacia di questi sistemi nell'ambito della modellazione del tratto enterico, riproducendo fedelmente il flusso luminale. [6] [5]

In conclusione, i bioreattori possono alloggiare diverse tipologie di materiale biologico e possono essere progettati per adattarsi alle necessità della coltura. Nel caso dello studio sperimentale in esame sono state sfruttate, all'interno del bioreattore fluidico, cellule Caco-2 e MC3T3.

Con il progredire del differenziamento, le prime dimostrano un fenotipo tipico delle cellule dell'epitelio intestinale, acquisendo proprietà di assorbimento. Le cellule MC3T3 hanno potenzialità osteogeniche e sono in grado di secernere, se sottoposte ai giusti stimoli, una ECM mineralizzata.

2. Apparato digerente

2.1 Cenni di anatomia funzionale

L'apparato digerente si compone di diverse parti, ovvero: bocca, esofago, stomaco, intestino tenue e intestino crasso, assieme ad altre componenti annesse (Figura 5). L'azione combinata di questi organi rende possibile la lavorazione del cibo ingerito, permettendo l'estrazione dei nutrienti in esso contenuti. Questo processo avviene, prevalentemente a livello dell'intestino. [7] [8] [9]

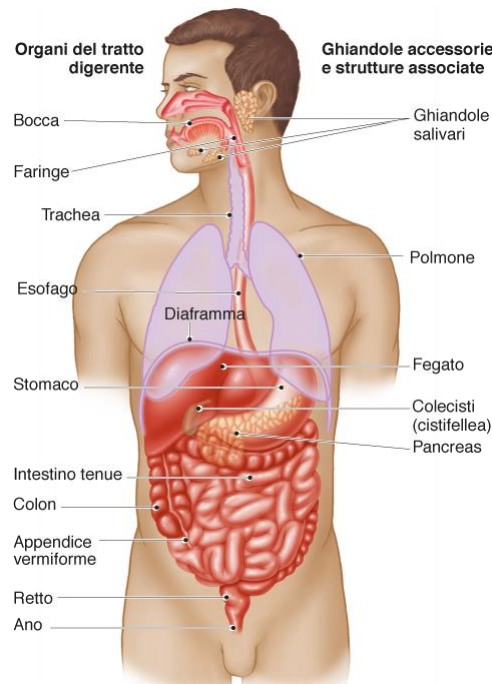


Figura 5 Schema generale dell'apparato digerente

Nell'individuo adulto, l'intestino può arrivare ad una lunghezza di 10 metri e per poter essere contenuto nella cavità addominale mostra una grande quantità di ripiegamenti. Le due porzioni di cui si compone sono l'intestino tenue e il crasso.

Il primo è a sua volta suddiviso in duodeno, digiuno e ileo. Questi tratti mostrano fra loro peculiarità sia anatomiche che funzionali ma, complessivamente, l'attività di maggior rilievo del tenue è quella di assorbire i principi nutritivi degli alimenti, avvalendosi anche dell'azione combinata di altri organi come pancreas, fegato e colecisti.

Nel duodeno, lungo circa 25 centimetri, il pH fortemente acido del chimo appena processato dal succo gastrico dello stomaco, viene tamponato grazie alla bile proveniente dal fegato e dal succo digestivo del pancreas, entrambi basici, grazie all'alto contenuto di bicarbonato di sodio. L'intestino tenue, infatti, non è provvisto di una barriera protettiva di muco spessa quanto quella che protegge lo stomaco e l'acidità del chimo (bolo di cibo sottoposto alla digestione gastrica) non neutralizzato

potrebbe provocare grossi danni alla mucosa. Il tratto successivo, il digiuno, è lungo da 2 a 3 metri e in esso il chimo transita rapidamente per poi sfociare nell'ileo, della lunghezza di 4 metri. Per l'intero tratto dell'intestino tenue il chimo viene attaccato da diversi tipi di enzimi digestivi specifici per i vari nutrienti, trasformandosi in chilo, che raggiunge la valvola ileo-cecale e, attraversandola, raggiunge l'intestino crasso.

Quest'ultimo è suddiviso in tre sezioni: il cieco, lungo pochi centimetri; il colon, che presenta un lume più largo e che si allunga per 1,6 metri, estendendosi in tre sezioni: ascendente, trasverso e discendente e, infine, il retto, dal quale verranno espulsi i residui fecali. Poiché la maggior parte dei nutrienti viene prelevata dalla mucosa del tenue, l'intestino crasso ha la principale funzione di riassorbire acqua e sali minerali dai residui non digeribili, compattando le feci.

Nell'intestino, inoltre, risiede quello che viene definito microbiota intestinale, ovvero la comunità batterica (che comprende anche virus, funghi e archea) che convive in simbiosi mutualistica con il corpo dell'ospite umano. La densità di popolazione del microbiota aumenta progressivamente dal tenue prossimale al colon, dove raggiunge il suo picco massimo ($10^9 - 10^{12}$ UFC/ml). [7]

Le principali funzioni di quella che prende anche il nome di flora batterica sono:

- ④ Interazione con il sistema immunitario intestinale (GALT), indirizzandone lo sviluppo attraverso la secrezione di sostanze derivate dal metabolismo dei nutrienti, all'interno del lume (postbiotici). Tale meccanismo è particolarmente rilevante nei primi anni di vita. [10] [11]
- ④ Difesa da patogeni esterni grazie alla secrezione di batteriocine e alla competizione per i substrati nutritivi.
- ④ Metabolismo di sostanze pro-cancerogene e degli estrogeni.
- ④ Digestione di sostanze non altrimenti metabolizzabili, a causa della mancanza degli enzimi specifici, come le fibre alimentari e successiva secrezione di composti utilizzabili dal corpo umano, come vitamine e SCFA (Short-Chain-Fatty-Acids, ovvero acidi grassi a catena media).
- ④ Rilascio di sostanze con funzione ormonale e paracrina per la regolazione nervosa, con conseguente influenza sui segnali di fame e sazietà. [7] [12]

La parete dell'intestino (che presenta una struttura simile fra le varie sezioni) è suddivisa in quattro strati concentrici (Figura 6) denominati, dal più interno al più esterno: mucosa (formata a sua volta da membrana mucosa, lamina propria e muscularis mucosae), sottomucosa, muscularis externa (della quale fanno parte la muscolatura circolare e quella longitudinale) e sierosa.

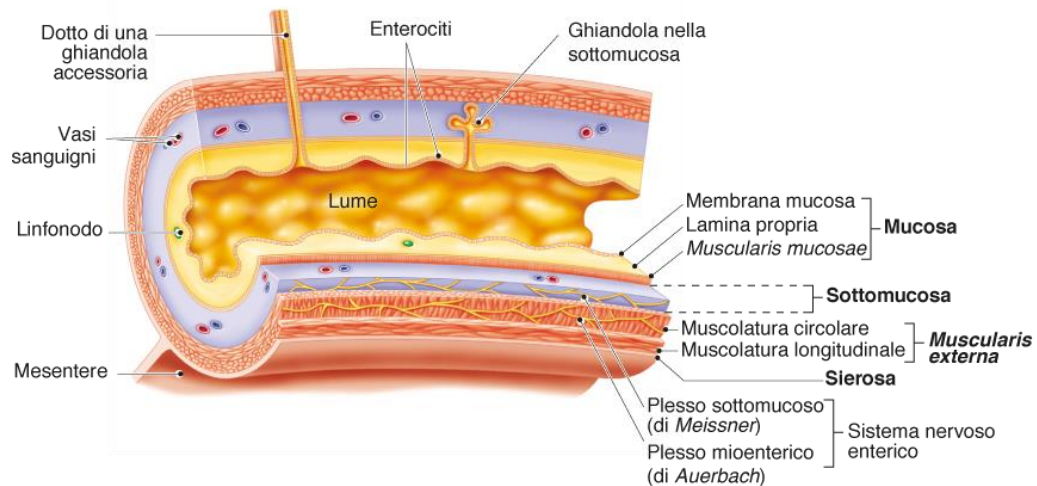


Figura 6 Rappresentazione della parete intestinale dal punto di vista istologico

Questi strati sono innervati da entrambe le branche del sistema nervoso autonomo (SNA) e dai plessi (sottomucoso e mioenterico) di quello che prende il nome di sistema nervoso enterico (SNE). Questa branca del SNA della quale, solo negli ultimi anni, è stato scoperto l'elevato grado di complessità (che gli è valso l'appellativo di "secondo cervello"), controlla la secrezione di diverse molecole da parte delle cellule epiteliali intestinali (come la serotonina e la sostanza-P), oltre a regolare la contrazione della muscolatura liscia non volontaria. Quest'ultima, si compone di uno strato esterno di fibre disposte longitudinalmente e uno concentrico, più interno, di fibre circolari che, contraendosi, provvedono rispettivamente ai movimenti di peristalsi e segmentazione. Oltre a tale meccanismo è nota la presenza in parete di cellule pacemaker (in grado di scatenare potenziali d'azione autonomamente, senza la necessità di innervazione), denominate cellule interstiziali del Cajal (ICC).

Queste, sono cellule mesenchimali fenotipicamente a metà fra fibroblasti e cellule muscolari lisce con la funzione di dare origine al ritmo elettrico di base (REB): una lenta oscillazione del potenziale di membrana delle ICC stesse intervallata da picchi di depolarizzazione e fasi di plateau.

[7] [8] [13]

2.2 La mucosa dell'intestino tenue

La parte di maggiore interesse della parete intestinale, può essere identificata nella mucosa. Essa è l'unico strato che entra in comunicazione diretta con il lume e il cibo che lo attraversa, pertanto, la sua superficie è plasmata in modo da offrire la maggiore area di contatto possibile per massimizzare l'assorbimento dei nutrienti contenuti nei cibi (che si realizza per il 90% proprio nel tenue). La sua superficie è caratterizzata dalla presenza di estroflessioni composte di tessuto connettivo (della lunghezza media di circa 1µm) chiamate villi (Figura 7E), che permettono di espandere l'interfaccia stabilita con il lume intestinale. Alla base di villi sono posizionate le cripte: invaginazioni dell'epitelio nelle quali le cellule esprimono particolari proprietà staminali. [14]

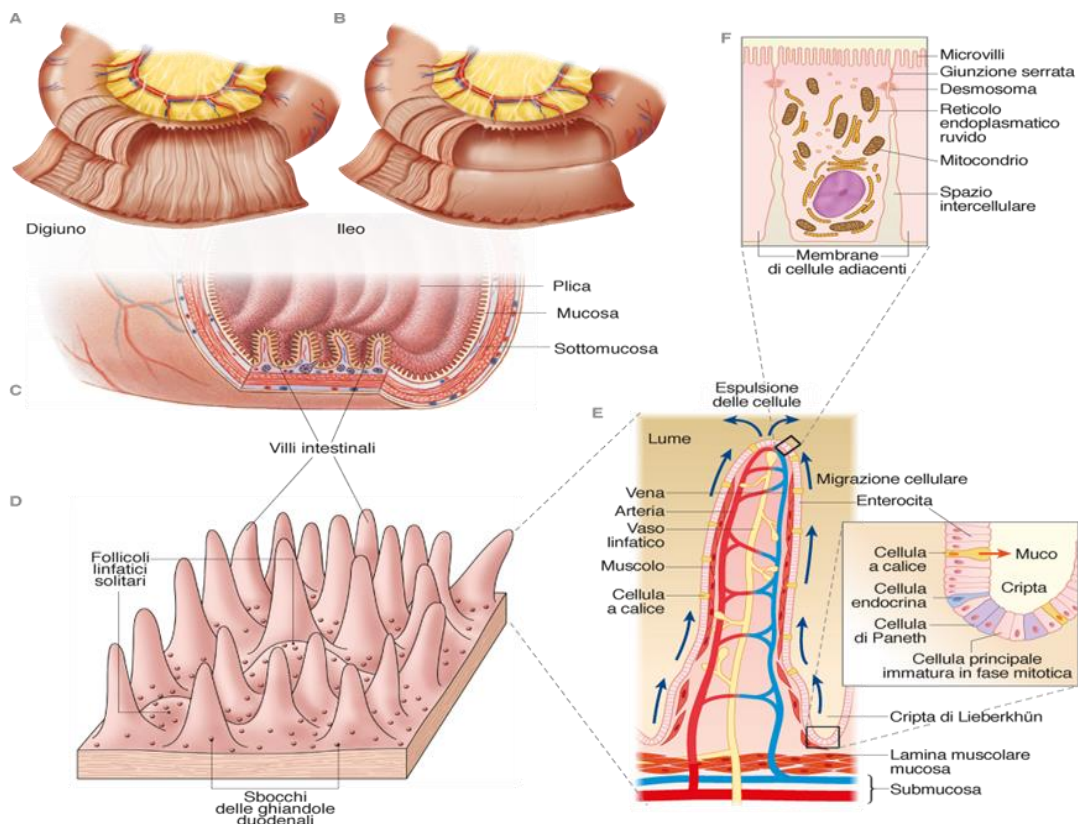


Figura 7 Struttura della mucosa dell'intestino tenue dove è possibile la parete del (A) digiuno ricca di pliche e (B) dell'ileo, priva di pliche. (C) Vista in sezione della parete intestinale. (D) ingrandimento della mucosa, che presenta le caratteristiche estroflessioni dette villi. (E) Sistema vascolare interno al villo. (F) Enterocita appartenente all'epitelio che riveste il villo.

2.2.1 Trasporto e assorbimento intestinale

L'epitelio che ricopre la mucosa è composto da diversi tipi di cellule, che possono essere raggruppate in cellule con funzione di assorbimento o di secrezione.

Nel primo gruppo possono essere collocati gli enterociti (Figura 7F), che rappresentano l'80% della comunità cellulare dell'epitelio intestinale e sono i principali responsabili dell'uptake dei nutrienti.

Queste cellule specializzate presentano una spiccata polarizzazione fra il lato basolaterale, che si affaccia sul liquido interstiziale e quello apicale, o luminale, dove presentano estroflessioni della membrana cellulare chiamate microvilli (il cui insieme compone l'orletto a spazzola). Questa particolare geometria, che riprende quella macroscopica proposta dai villi intestinali, permette di ampliare ulteriormente la superficie di assorbimento.

Se il tenue non fosse provvisto di alcuna estroflessione, infatti, l'area di contatto con il contenuto luminale sarebbe ridotta a $2,5 m^2$, mentre la presenza dei villi la amplifica di 8 volte e quella dei microvilli di un ulteriore fattore 20, portando la superficie di contatto complessiva a $400 m^2$. A tale caratteristica è attribuibile la grande capacità di assorbimento intestinale, maggiormente pronunciata nella parte prossimale del duodeno, rispetto a quelle distali. [7] [15] [6] [16]

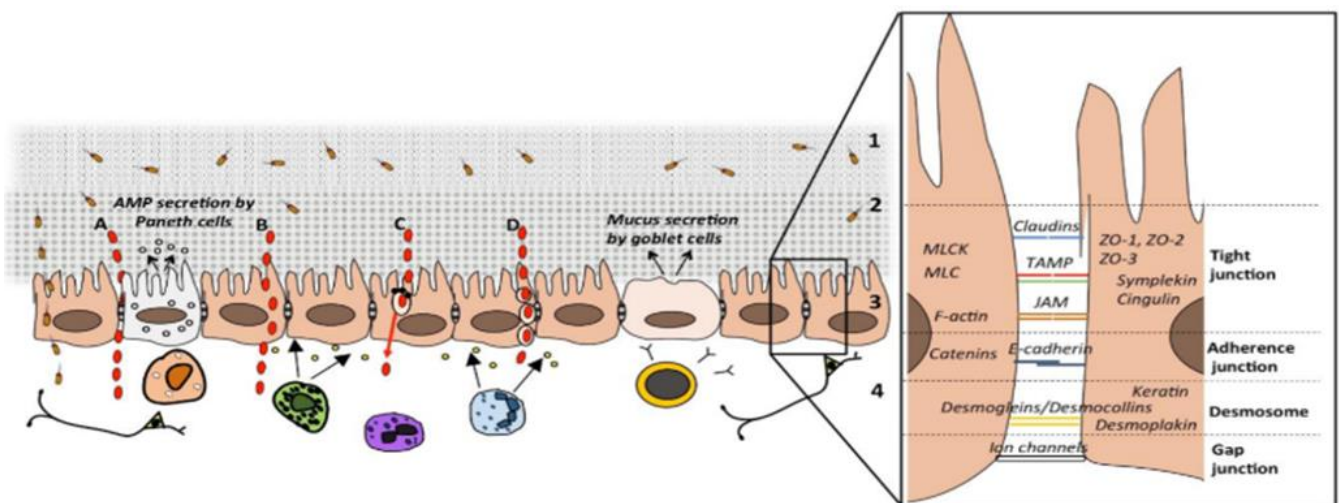


Figura 8 Schema della barriera epiteliale di spessore unicellulare in cui sono mostrate le vie di assorbimento (A) paracellulare, (B) transcellulare, (C) transcellulare attraverso pori acquosi o mediata da carrier specifici per i nutrienti e (D) tramite endocitosi, transitosi ed esocitosi.

Oltre a costituire la principale via deputata all'assorbimento dei nutrienti, la membrana epiteliale svolge un importante ruolo di difesa dell'organismo da agenti patogeni o estranei. Per adempire al meglio a questa funzione, ogni cellula epiteliale è unita a quelle adiacenti attraverso diversi tipi di giunzioni (Figura 8). Questi complessi giunzionali (formati da giunzioni serrate, giunzioni aderenti, giunzioni comunicanti e desmosomi) esercitano una selezione finemente regolata su ciò che può essere trasportato nel circolo sanguigno (sali, ioni, peptidi e altre molecole idrofiliche) e ciò che deve rimanere all'interno del lume per essere successivamente espulso (tossine, patogeni, batteri). A tale scopo, le giunzioni sono provviste di porosità che vanno da 0,75 nm di diametro nel duodeno a 0,35 nm nell'ileo.

Il trasporto di molecole può avvenire attraverso due diverse vie: paracellulare e transcellulare.

La via paracellulare permette il passaggio delle molecole idrofiliche voluminose, con un peso molecolare ≤ 600 Da *in vivo* e ≤ 10 kDa nei modelli *in vitro*, attraverso gli interstizi fra cellule adiacenti. Il trasporto di grandi molecole, come le proteine, è impedito dalle giunzioni cellulari, proteggendo efficacemente l'organismo dai patogeni. [17]

La via transcellulare permette il trasporto di molecole direttamente attraverso gli enterociti e, considerando che l'area di contatto fra enterociti e lume è maggiore di un fattore 1000 rispetto a quella complessivamente presentata delle giunzioni fra cellule, responsabili della via paracellulare, la maggior parte dei farmaci lipofili sono preferenzialmente assorbiti passivamente attraverso la cellula. Ciò rende lo studio della via transcellulare di particolare interesse in campo medico. [18]

Il trasporto transcellulare non è solamente il risultato di una diffusione passiva di molecole lipofile e piccoli composti idrofilici, ma può usufruire anche di carrier attivi (dipendenti dall'utilizzo di ATP). L'orletto a spazzola è, inoltre, provvisto di una grande quantità di enzimi e trasportatori passivi che si occupano, rispettivamente, della scomposizione dei nutrienti e del loro assorbimento all'interno della cellula. Alcuni esempi sono quelli della saccarasi, dell'isomaltasi e della lattasi che scompongono i carboidrati in glucosio, galattosio e fruttosio (tre zuccheri semplici), successivamente assorbiti tramite i trasportatori delle famiglie GLUT (carrier per il trasporto passivo facilitato) o SGLUT (canali sodio dipendenti per il trasporto attivo secondario degli esosi). Esempi simili possono essere fatti per l'assorbimento di proteine e peptidi, scomposti nei singoli aminoacidi dalle dipeptidasi e tripeptidasi.

Alcune molecole più grandi, come intere proteine e batteri, tuttavia, possono essere trasportate verso lo spazio interstiziale attraverso un processo che prevede i passaggi di endocitosi, transitosi e esocitosi. [17] [18]

Sono, inoltre, presenti meccanismi di trasporto atti a prevenire l'assorbimento di alcuni composti, come quello mediato da P-gp (Glicoproteina-P), che svolge la funzione di estrarre attivamente alcuni composti dal citoplasma degli enterociti per riversarli nel lume. La sua espressione è massima nell'ileo e nel colon, mentre è ridotta nel digiuno e nel duodeno. [19]

Una ulteriore tipologia di cellula con funzione di assorbimento, nell'intestino tenue, è quella delle cellule M (membranose), prive di villi, che separano il lume intestinale dalle placche di Peyer. Queste ultime sono popolate da linfociti B e linfociti T: cellule facenti parte del sistema immunitario. La funzione delle cellule M è quella di captare antigeni di provenienza alimentare o batterica e trasportarli per endocitosi verso lo strato sottomucoso, verso le placche di Peyer. Qui le cellule dendritiche entrano in contatto con l'antigene specifico e lo esprimono sulla propria superficie cellulare

attivando, in questo modo, le cellule linfocitarie (sia B che T) contro lo specifico bersaglio riconosciuto come non-self.

Sono state rilevate anche cellule molto rare (0,5% delle cellule epiteliali), denominate cellule tuft (del “ciuffo”), che si trovano all’apice dei villi. Le tuft cells sembrano avere una funzione protettiva contro le infezioni parassitarie attraverso il rilevamento chemocettivo delle minacce, detto sensing (un fenomeno simile a quello che avviene a livello delle papille gustative). [7] [8] [16]

2.2.2 Secrezione intestinale

A livello dell’epitelio può essere osservata la presenza di cellule che presentano un fenotipo secernente e che partecipano all’omeostasi intestinale.

- ④ Le cellule principali: secernono acqua ed elettroliti nel loro stato di maturazione completo. Mentre quando si trovano a livello delle cripte, ancora immature, possono secernere una soluzione isotonica di NaCl che contribuisce al mantenimento del livello ionico luminale.
- ④ Cellule mucipare o di Goblet: secernono mucine. La loro azione è particolarmente importante, poiché permette la lubrificazione delle pareti intestinale e rappresenta una efficace linea di difesa contro l’infiammazione che potrebbe essere causata da diversi tipi di patogeni o da una eccessiva acidificazione del lume. Inoltre, è stato dimostrato che tali cellule interagiscono direttamente con il GALT, regolando l’attivazione del sistema immunitario e modulando la loro produzione di muco in base allo stato infiammatorio dell’intestino. [20]
- ④ Cellule enteroendocrine: cellule rare, che rappresentano solo l’1% delle cellule epiteliali. Secernono serotonina (5-HT) e altri ormoni implicati nella regolazione di motilità, sazietà, infiammazione e risposta immunitaria, in risposta a stimoli di varia natura.
- ④ Cellule di paneth: possono essere classificate come cellule appartenenti al sistema immunitario, poiché secernono lisozima, defensine, peptidi antimicrobici (AMPs), che fanno parte degli agenti implicati nelle reazioni immunitarie innate e svariate citochine, fra cui il TNF.
- ④ Ghiandole del Brunner: stanziate nel duodeno al di sotto della muscolaris mucosae, presentano una forma acinosa e ramificata. La loro secrezione è rappresentata da mucopolisaccaridi.

Una ulteriore secrezione intestinale è rappresentata dallo sfaldarsi delle cellule epiteliali stesse, all’interno del lume intestinale. L’ambiente luminale fornisce stimoli chimici e meccanici che incentivano tale fenomeno, denominato Anoikis, particolarmente osservabile nella parte più apicale dei villi, dove lo stress di taglio causato dal flusso è maggiore e le cellule esprimono un grado di

differenziamento più avanzato. L'Anoikis è, implicato nel processo di equilibrio dinamico fra morte e differenziamento delle cellule epiteliali. Inoltre, i frammenti cellulari esfoliati (che andranno a comporre buona parte dei residui fecali) contengono al loro interno, enzimi ancora in grado di svolgere la loro funzione catalitica sul contenuto intestinale.

2.2.3 Differenziamento e staminalità dell'epitelio.

Nell'intestino tenue, ogni giorno, vengono trascinate via dal flusso luminale circa 1400 cellule epiteliali per ogni villo (con una perdita totale giornaliera di 10^{11} unità cellulari) perciò, per mantenere l'integrità della mucosa, è necessaria la continua sostituzione delle cellule perse. L'intera barriera epiteliale, infatti, si rivela essere l'organo con il rinnovamento più rapido nell'intero organismo, con un turn-over completo che avviene in appena 3-5 giorni, a partire dalle cripte. [16] [21]

Queste, come già accennato, sono invaginazioni della membrana, sul fondo delle quali viene creato un ambiente, chiamato nicchia, che presenta condizioni ottimali per la riproduzione e il differenziamento di un piccolo gruppo di cellule con attività staminale (ISCs: Intestinal Stem Cells) e proliferativa. Per rendere sostenibile il rapido processo di rinnovamento intestinale, le cellule della cripta sono in grado di riprodursi in modo simmetrico o asimmetrico, in base alla specifica necessità.

Alloggiate nella nicchia sono state riconosciute diverse tipologie di cellule staminali, ma quelle che hanno dimostrato un tasso di replicazione più rapido, contribuendo maggiormente al rinnovamento epiteliale sono le Lgr5-positive. La loro attività è fortemente influenzata da fattori chimici e molecolari implicati anche nello sviluppo di altri tessuti come Wnt, Notch e EGF (Epidermal Growth Factor). Altre ISCs coabitano la nicchia con le Lgr5-positive, come le label-retaining cells (LRCs) che, replicandosi più lentamente, rappresentano una riserva del pool di staminali. [21] [14]

I fattori chimici che sottendono al rinnovamento epiteliale variano gradualmente, in termini di concentrazione lungo l'asse cripta-villo, rispecchiando il grado di differenziamento cellulare che si riscontra risalendo dal fondo delle introflessioni, dove la staminalità è massima, verso il lume, dove le cellule sono completamente differenziate (Figura 9).

Una piccola quantità di cellule differenziate, tuttavia, è presente anche all'interno delle cripte con la funzione di rendere la nicchia ospitale per l'attività delle ISC. In particolare, è possibile trovare cellule di Paneth, secernenti peptidi antimicrobici, e fibroblasti, miofibroblasti e cellule muscolari lisce, che provvedono all'ancoraggio della cripta alla matrice extracellulare sottostante. [21] [22]

L'attivazione delle ISCs può essere modulata anche dallo stato di integrità dell'epitelio poiché, in caso di un danno tissutale, è possibile che la popolazione di Lgr5-positive si esaurisca. Tale evento porta alla dedifferenziazione di diverse tipologie di cellule adulte per far fronte all'aumentata richiesta di turn-over epiteliale. Persino la dieta e alcuni fattori rilasciati dalla comunità microbica intestinale, come evidenziato da recenti studi, sembrano avere un impatto sia sull'omeostasi che sul processo di riparazione della mucosa (Figura 9B). [23]

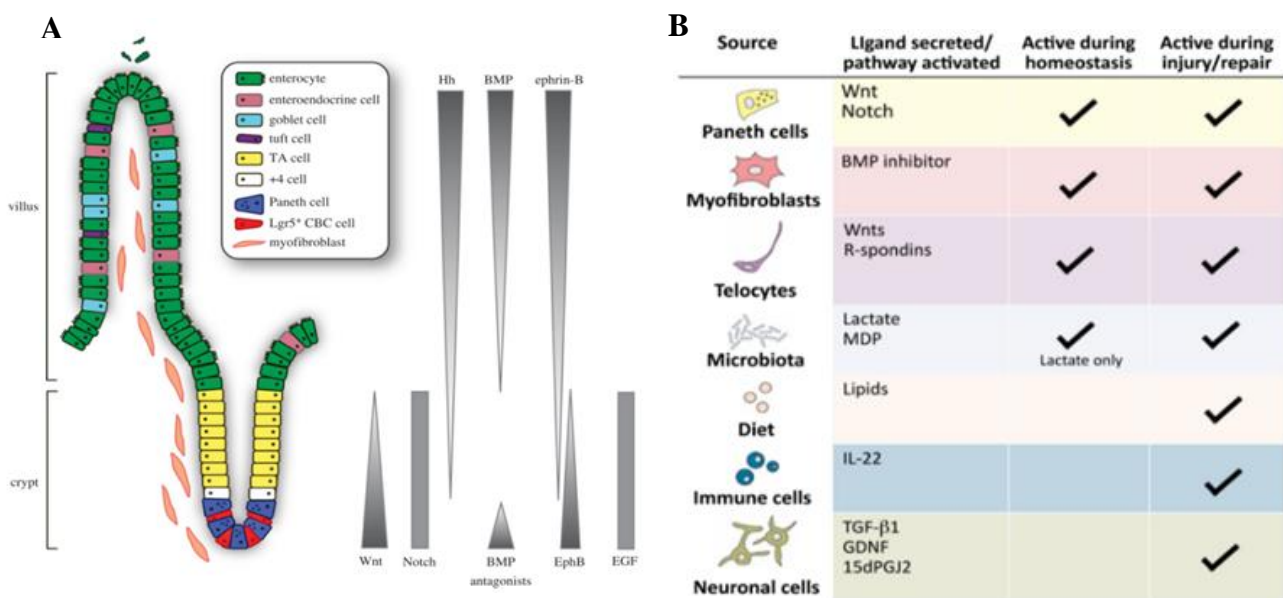


Figura 9 (A) Schema dell'asse Cripta-villo e delle diverse cellule che compongono l'epitelio intestinale. Lungo tale asse diverse molecole di segnale, come fattori di crescita e citochine presentano specifici gradienti di concentrazione, causando il diverso grado di differenziazione delle cellule. (B) Le diverse cellule epiteliali possono attivare diverse vie metaboliche che regolano l'attività omeostatica e i meccanismi di riparazione intestinali, a seconda della necessità.

2.3 Patologie del sistema digerente

L'apparato digerente può essere colpito da una grande varietà di patologie, che possono risultare invalidanti e di difficile trattamento a causa della complessa interazione dei componenti del tratto gastroenterico. Strategie di intervento possono prevedere sia un cambiamento dello stile di vita e dell'alimentazione del soggetto colpito, sia l'assunzione di farmaci introdotti, nella maggioranza dei casi, per via orale, in virtù della maggiore semplicità di somministrazione. La capacità dell'organismo di ogni individuo di assorbire queste molecole terapeutiche, tuttavia, è soggetta a grande variabilità, che rischia di influenzare negativamente l'effetto atteso, riducendo l'efficacia della cura o, addirittura, causando una risposta sistemica avversa. In caso di una alterazione funzionale dell'apparato digerente (e in particolar modo dell'intestino), è stata dimostrata una difficoltà ancora maggiore nel prevedere il comportamento dell'organismo in risposta ai farmaci, poiché vengono perturbati parametri come la farmacocinetica e la farmacodinamica del composto somministrato. [24]

- ⊗ IBS: la IBS (Irritable Bowel Syndrome o sindrome dell'intestino irritabile) è descritta come un disordine intestinale funzionale (FBD – Functional Bowel Diseases). Ha un'alta prevalenza media, che si attesta attorno al 10% nella popolazione mondiale, spaziando dall'1,1% al 45% in base alla popolazione studiata. La gravità e la tipologia di sintomi possono variare enormemente fra gli individui che ne sono affetti, con manifestazioni che vanno da leggeri squilibri gastrointestinali a disagi, come gonfiore, dolore addominale e nausea, in grado di minare fortemente la qualità di vita del paziente. Alla IBS sono associati anche sintomi di natura psichiatrica, come ansia e depressione, ai quali possono aggiungersi comorbidità come fatica cronica, gonfiore, intolleranze nutrizionali ed emicranie. La diagnosi stessa di IBS si basa esclusivamente sulla sintomatologia, poiché i disturbi causati dalla patologia non sono associati a biomarcatori chimici o strutturali registrabili nell'organismo. La tipologia di sintomo permette, inoltre, di effettuare una distinzione fra diverse categorie di IBS: IBS-C (costipativa), IBS-D (diarroica), IBS-M (con sintomi misti fra C e D). Le cause scatenanti della sindrome non sono ancora chiare a causa della sua multifattorialità, tuttavia, alcune dei fattori di rischio preponderanti sono: il sesso dell'individuo (la popolazione femminile ne è maggiormente affetta), l'età (l'incidenza è maggiore al di sotto dei 50 anni) e la presenza, nella storia clinica del soggetto, di precedenti infezioni a carico del tratto gastrointestinale di origine batterica o virale. Alcune condizioni in concomitanza delle quali è stata osservata una maggiore possibilità di insorgenza di IBS sono: una mancata regolazione del SNE, uno stato disbiotico e un'augmentata permeabilità intestinale. [26] [25] [26]

⊗ IBD: la IBD (Inflammatory Bowel Disease) si tratta di una condizione infiammatoria cronica idiopatica, che può provocare gravi danni al tratto gastrointestinale, intaccandone la funzionalità a lungo termine e persino le proprietà meccaniche, causando un irrigidimento della mucosa. [27]

Come nel caso della IBS, le cause scatenanti non sono note, ma alcuni fattori ambientali (e lo stile di vita in generale) sembrano rivestire un peso maggiore rispetto quelli di natura genetica, sulla sua insorgenza. L'IBD affligge più di 6,8 milioni di persone nel mondo e i casi, prevalentemente localizzati nelle zone industrializzate, sono in continuo aumento, rappresentando un grave problema di carattere sanitario ed economico. Le strategie terapeutiche più utilizzate sfruttano l'azione di farmaci immunosoppressori e antinfiammatori, ma questi trattamenti non si rivelano efficaci nella totalità dei casi e, se non si verifica una remissione della patologia, può essere necessaria la resezione chirurgica di parte dell'intestino: pratica che porta inevitabilmente a scompensi nell'assorbimento di farmaci e nutrienti e intacca la qualità della vita del paziente. [16]

L'IBD è classificata in base al tratto della mucosa maggiormente interessato dall'infiammazione, come: Colite ulcerosa (UC – Ulcerative Colitis), che ricopre un 70% dei casi, o Morbo di Crohn (CD – Crohn's Disease) registrato nel restante 30% di pazienti affetti da IBD.

Nella UC, lo stato infiammatorio è limitato al colon, dove si registra una maggiore attivazione immunitaria e una diminuita capacità di riassorbire i liquidi. Gli effetti della UC possono essere: perdita di peso, dolori addominali, vomito, diarrea e costipazione. Nella maggior parte dei casi, tale patologia si presenta con periodi di acutizzazione dei sintomi alternati ad altri di quiescenza.

Il CD interessa il tratto intestinale nella sua interezza. Rispetto alla UC, la cui incidenza massima si attesta fra i 25 e i 35 anni, quella del CD si presenta precocemente: tra 15 e 25 anni. L'area maggiormente colpita è l'ileo terminale (45% dei casi), seguito dal colon (32% dei casi): entrambe aree fortemente colonizzate dalla flora batterica intestinale. A causa della vasta superficie mucosa affetta, il CD è associato ad un alto rischio (da due a sei volte maggiore rispetto ai soggetti sani) di sviluppare vari tipi di forme tumorali come il cancro al colon retto (CCR). [24] [16] [28]

In entrambe le forme di IBD può essere riscontrata una disfunzione delle cellule appartenenti al sistema immunitario. In particolare, le cellule di Paneth hanno mostrato un

aumentato grado di proliferazione a livello del colon, dove normalmente non sono espresse, rilasciando peptidi antimicrobici all'interno del lume. In casi di CD ileale, tuttavia, l'espressione delle cellule di Paneth si è rivelata minore in tale tratto del tenue, dando la possibilità ad agenti patogeni di proliferare e intaccare la mucosa. [28]

Il legame fra IBD e microbiota è ancora in fase di ricerca, ma ci sono evidenze di un certo grado di cross-talk fra comunità batterica commensale e ospite, che può essere causa di un metabolismo alterato di peptidi, acidi grassi e vitamine, alterando, di conseguenza, la risposta del GALT e incentivando il rilascio di fattori neoplastici. [29]

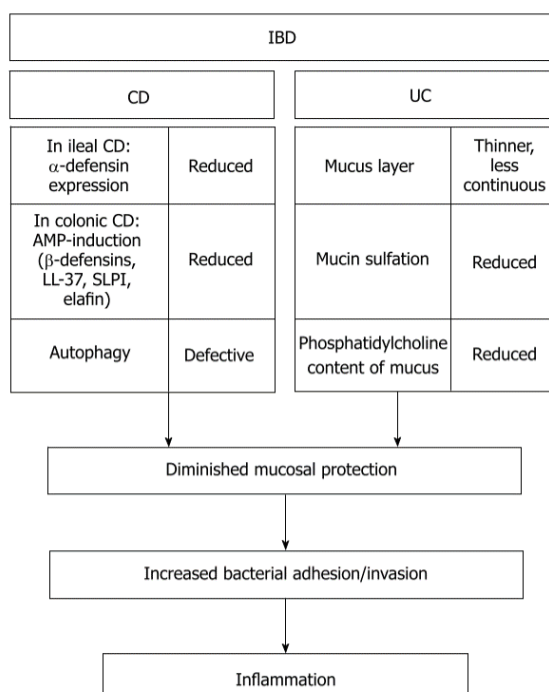


Figura 10 Effetti dell'IBD sulla mucosa intestinale separati per le due forme: UC (colite ulcerosa) e CD (Morbo di Crohn).

④ Cancro al colon retto (CCR): il cancro al colon retto è una neoplasia caratterizzata da un'elevata incidenza, in quanto si attesta come la terza forma tumorale più diagnosticata, con un 6,1% dei casi tumorali totali, sia nell'uomo (nel cui caso è preceduto solo dal cancro al polmone e quello prostatico), che nella donna (con al primo posto nuovamente il cancro polmonare, seguito dal tumore al seno), mentre raggiunge la seconda posizione in termini di mortalità (9,2%). Tale percentuale lo porta, inoltre, ad essere la seconda causa di morte legata a neoplasia nel mondo.

Nel 2020 sono stati riscontrati 1,9 milioni di casi globali, con 935000 decessi, andando

a segnare un aumento consistente rispetto agli anni precedenti, soprattutto nei paesi più industrializzati e caratterizzati da un alto HDI (Human Development Index). Alla luce di questi dati è stato stimato che, entro il 2030, l'incidenza del CCR subirà un aumento del 60%, con 2,2 milioni di nuovi casi annui, dei quali 1,1 milioni porteranno i pazienti al decesso.

I fattori scatenanti del CCR sono molteplici e di varia natura, ma i meccanismi sottesi alla patogenesi non sono, attualmente, del tutto compresi. Alcuni dei fattori di rischio ambientali indicati dalle linee guida sono: un elevato consumo di bevande alcoliche, il fumo di sigaretta, la sedentarietà l'obesità e il sovrappeso. Quest'ultimo aspetto, in particolare, è strettamente legato a quello riguardante l'adeguatezza delle abitudini alimentari della popolazione.

Il microbiota sembra essere direttamente implicato, attraverso la gestione degli acidi biliari, nell'insorgenza di CCR. Inoltre, la comunità microbica, in caso di disbiosi, può rilasciare citochine, batteriocine e altre molecole di segnale che provocano infiammazioni, reazioni autoimmuni e danni genetici alle cellule epiteliali.

I trattamenti più sfruttati per la cura del CCR sono la resezione della massa tumorale (quando possibile e in assenza di metastasi evidenti), la cura chemioterapica o una combinazione delle due. Malgrado l'elevato tasso di mortalità, la prognosi migliora enormemente se la forma tumorale è rilevata e trattata nei suoi primi stadi di sviluppo. Per tale motivo si rivela particolarmente importate sviluppare tecniche di screening rapide e poco invasive per effettuare la diagnosi con controlli routinari. [29] [30] [31]

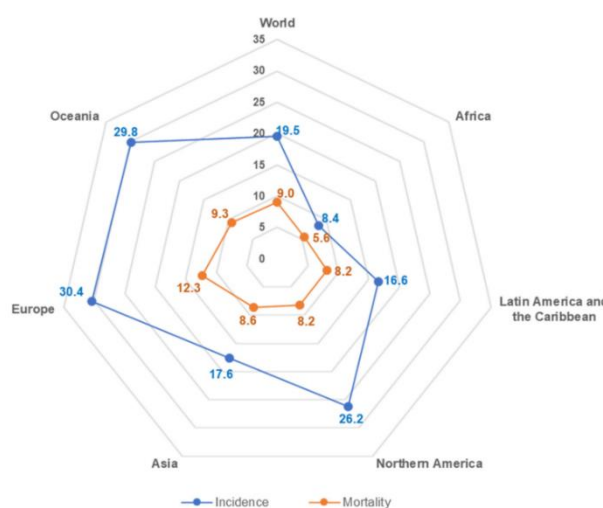


Figura 11 Dati riguardanti l'incidenza e la mortalità standardizzate del cancro al colon per entrambi i sessi, raccolti nel 2020.

⊙ SIBO: Per SIBO (Small Intestinal Bacterial Overgrowth) si intende una condizione caratterizzata dall'aumento della concentrazione di batteri all'interno dell'intestino tenue, a causa della colonizzazione di organismi provenienti dal colon. Normalmente, nel tenue, la comunità batterica presenta una concentrazione di $10^3 CFU/ml$ (CFU: Colony Forming Units), ma quando questo valore raggiunge $10^5 CFU/ml$, è possibile diagnosticare lo stato di proliferazione incontrollata denominato, appunto, SIBO. [32]

Le conseguenze di tale condizione possono manifestarsi come gonfiore, dolore addominale e diarrea, ma ad esse possono associarsi anche gravi deficienze nutrizionali dovute al malassorbimento di alcune vitamine (come B12, A, D ed E) e minerali come calcio e ferro, la cui carenza può causare, rispettivamente danni ossei e anemia. Oltre alla quantità, anche la tipologia di batteri all'interno del tenue, subisce una variazione, spostando il bilancio verso una flora maggiormente popolata da speci anaerobiche, prevalentemente Gram-negative. [32] [33]

Il SIBO è associato a CD, in cui si presenta nel 45,2% dei casi e, più raramente, a UC con un'incidenza del 17,8% dei casi. Può, inoltre, essere osservato anche con l'insorgenza di IBS o in caso di alcuni trattamenti antibiotici. [24]

Il metodo più sfruttato per diagnosticare il SIBO è il breath test al lattulosio e idrogeno-metano: un esame che si distingue per la bassa invasività e la facilità di utilizzo. Tuttavia, può essere effettuata anche una analisi del campione fecale tramite il sequenziamento 16S rRNA per meglio caratterizzare le speci microbiche presenti. [34]

⊙ Leaky gut syndrome: si tratta di una patologia ancora molto discussa, che si presenta spesso in concomitanza di altre morbidità, sia legate alla fisiologia del tratto gastrointestinale che extra-enteriche. Questa condizione è caratterizzata dalla minore capacità dell'epitelio di selezionare le molecole in grado di oltrepassarlo per essere assorbite rendendo, così, la mucosa, maggiormente penetrabile da parte di sostanze quali cibo non digerito, tossine e microrganismi, che passano nel sangue. Ciò è causato da un allentamento (minore espressione o disgregazione) delle giunzioni serrate fra le cellule epiteliali. L'origine dell'aumentata permeabilità intestinale è strettamente associata ad un certo grado di infiammazione cronica e ad uno stato disbiotico, ma allergie e altri stimoli stressogeni (probabilmente agenti sul SNE) possono aggravare la condizione. [35]

Si manifesta spesso in concomitanza di IBD, con l'assunzione di alte dosi di farmaci antinfiammatori come gli NSAIDs (Non-Steroidal Anti-inflammatory Drugs) e nella quasi totalità dei casi di sindrome celiachia (o sindrome celiaca): una malattia autoimmune che si presenta con l'assunzione di quantità anche molto ridotte di glutine e si manifesta a livello intestinale con un evidente appiattimento dei villi e, eventualmente, la morte degli enterociti.

Oltre a sintomi di natura gastroenterica, la permeabilità intestinale è stata associata anche ad autismo, sindrome da affaticamento cronico, artrite reumatoide, sclerosi multipla e fibromialgia, anche se ulteriori studi sono necessari per accertare il legame con queste manifestazioni invalidanti. [7] [35]

Per l'analisi della permeabilità intestinale possono essere sfruttate diverse strategie come l'utilizzo di sonde molecolari (spesso mono o disaccaridi) delle quali viene valutato l'assorbimento intestinale. In alternativa, possono essere sfruttate due diverse tecniche endoscopiche, ma il dosaggio sierico o plasmatico di zonulina (la cui presenza è associata ad un disassemblaggio delle giunzioni fra cellule epiteliali), sembra essere uno dei più affidabili marcatori di aumentata permeabilità. [17] [36]

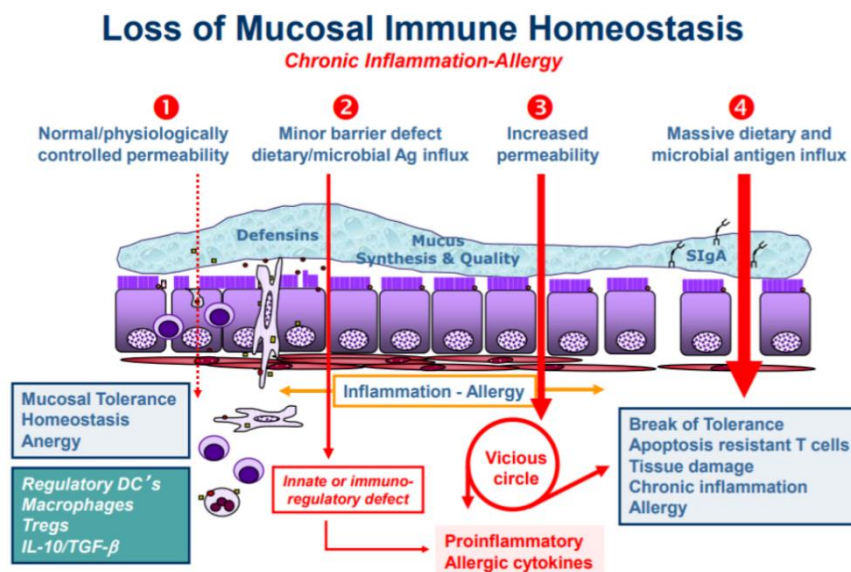


Figura 12 Ciclo infiammatorio che porta alla permeabilità della mucosa

2.4 Modelli di assorbimento intestinale

Gli stati patologici sopra riportati possono avere un'influenza enorme sulla risposta dell'organismo alla somministrazione di farmaci o all'ingestione di molecole di origine alimentare. Infatti, l'alterazione della permeabilità dell'epitelio, l'infiammazione, la disbiosi, l'ispessimento o l'assottigliamento dello strato di muco, assieme a variazioni di pH, di volume di fluido, secrezioni enzimatiche e della motilità luminale, andranno necessariamente a modulare la biodisponibilità dei composti ingeriti in modo non sempre prevedibile. [24]

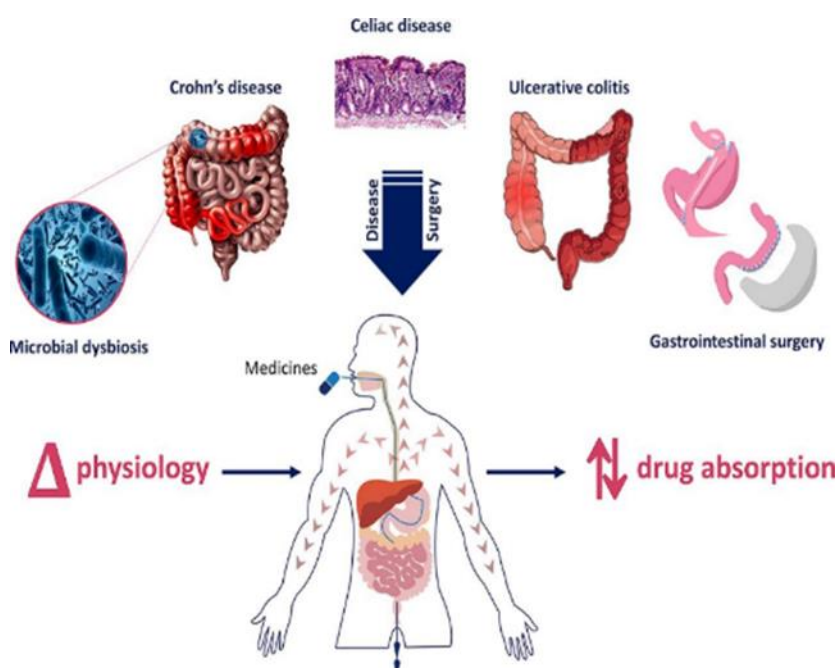


Figura 13 Schema che illustra il legame fra patologie gastrointestinali e la differenza nell'assorbimento intestinale dei farmaci che esse possono causare, rispetto allo stato fisiologico.

Un ulteriore fattore di variabilità riguarda le differenze fisiologiche rilevabili fra soggetti diversi (inter-soggetto) a causa delle caratteristiche genetiche e delle influenze ambientali e quelle che possono essere riscontrate nell'organismo della stessa persona (intra-soggetto) in momenti e condizioni distinti. Per questi motivi, nel periodo di studio pre-clinico di nuovi farmaci deve essere presa in considerazione una grande quantità di casi specifici, allo scopo di rendere la terapia sicura ed efficace per la percentuale più ampia possibile di pazienti. La sfida della medicina, in questo campo è, perciò, quella di sviluppare terapie personalizzate e adattabili in base alle caratteristiche biologiche del paziente e alle sue specifiche necessità.

Sono state sviluppate diverse strategie per rendere più efficace la somministrazione e l'assorbimento dei farmaci attraverso tecniche di drug-delivery per via orale. Queste tecniche mirano a soddisfare principalmente uno o più dei tre seguenti obiettivi:

- ④ Il trattamento di disturbi locali gastroenterici, senza la necessità che il principio entri nel circolo sistemico.
- ④ Il trasporto del principio attivo nel circolo sanguigno attraverso l'epitelio per sortire un effetto anche a livello di organi e tessuti extra-enterici.
- ④ Aumentare la solubilità di altri farmaci per facilitarne la dissoluzione e l'assorbimento.

I fattori da considerare e modulare per sortire gli effetti desiderati, oltre a quelli già citati, sono: la concentrazione del farmaco, la sua solubilità in acqua, la sua lipofilità (fattore che influenza particolarmente il passaggio attraverso il doppio strato fosfolipidico della membrana), lo stato di ionizzazione del composto e il metodo di incapsulamento. [9]

In medicina sono documentati casi di utilizzo di nanoparticelle per una maggiore efficienza di delivery e assorbimento. Sono stati utilizzati rivestimenti in polimeri con un tasso di degradazione temporizzato in base al periodo medio di transito lungo i tratti gastrico, intestinale e colonico (benché l'estensione di questi periodi temporali risenta particolarmente della variabilità biologica e delle abitudini dietetiche).

Altre strategie prevedono un coating in polisaccaridi con struttura non amidacea (simile a quella delle fibre alimentari, scomposte nel colon dal microbiota anaerobico che vi risiede) che verrà digerito preferenzialmente nella parte distale del crasso, rilasciando localmente il farmaco terapeutico. Questo tipo di materiali, essendo di origine naturale, ha dimostrato una bassa tossicità e un range molto ampio di pesi molecolari fra cui scegliere, in base all'applicazione specifica. Inoltre, è possibile sfruttare le caratteristiche di acidità locale specifica dei vari tratti dell'apparato digerente per avere un rilascio controllato del farmaco in un definito intervallo temporale. [9] [37]

Lo studio dell'insieme dei processi in atto nel sistema GI di Assorbimento, Distribuzione, Metabolismo ed Eliminazione (spesso raggruppati nell'acronimo ADME) delle molecole somministrate (siano esse di natura alimentare o farmacologica), richiede metodi e strumenti predittivi rapidi, affidabili e poco costosi che possono essere individuati nei modelli *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* su animali. Solo dopo una validazione attraverso di essi è possibile passare alla sperimentazione sull'uomo. [36]

Nell'ambito dei modelli intestinali *in vivo* è stato dimostrato come alcuni processi di assorbimento, ad esempio quello diffusivo, possono essere fedelmente riprodotti con l'utilizzo di modelli animali, mentre altri non risultano altrettanto accurati. Una famiglia di enzimi digestivi e deputati alla detossificazione dell'organismo è quella dei CYP (citocromo), di cui fanno parte sia elementi inducibili, che costitutivi. Diverse isoforme sono particolarmente espresse all'interno del

lume intestinale, in particolare sulla superficie apicale degli enterociti maturi. Tuttavia, l'abbondanza, la distribuzione lungo il tratto gastroenterico e la selettività dei substrati che gli enzimi del CYP sono in grado di legare, presentano differenze interspecie non trascurabili (Figura 14). Per ovviare alla discrepanza sono stati sviluppati modelli murini geneticamente modificati con lo scopo di escludere alcuni geni responsabili dell'espressione di particolari isoforme di CYP dell'intestino e nel fegato. Meccanismi compensatori da parte dell'organismo dell'animale, però, possono causare la difficoltà nell'interpretazione dei dati raccolti. [38].

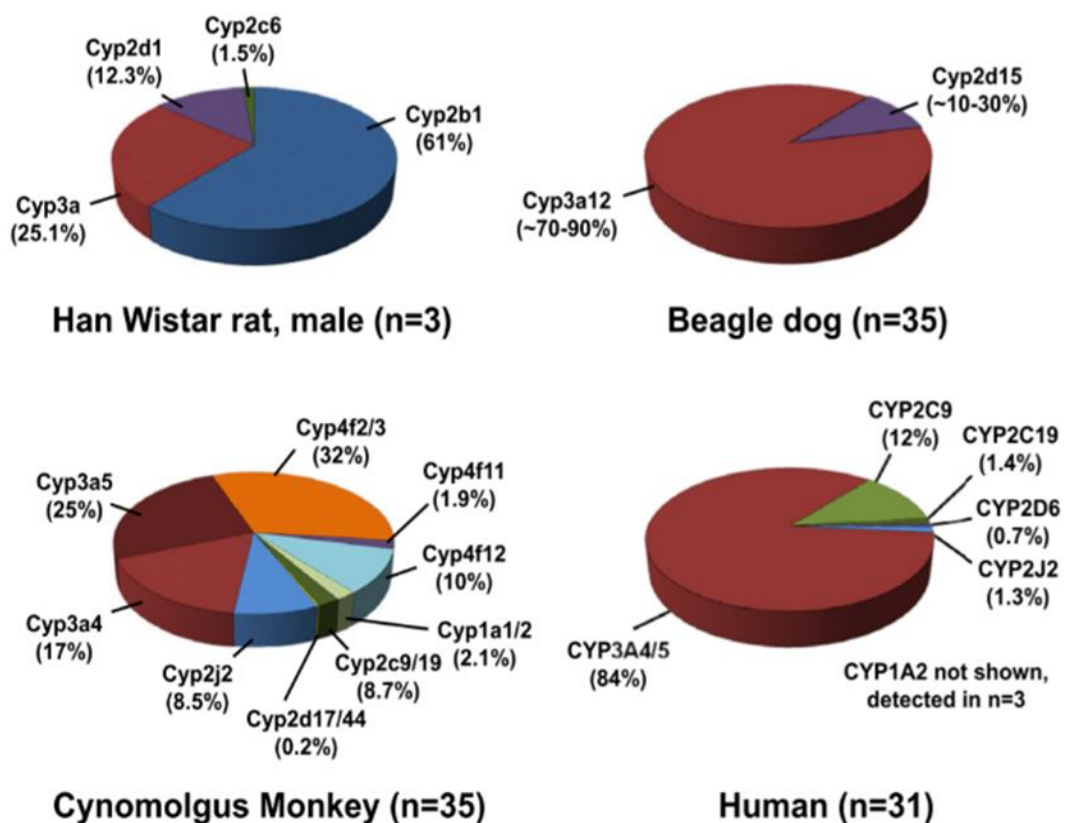


Figura 14 Differenti isoforme di CYP450 espresse nell'intestino tenue di diverse specie animali (ratto, cane, scimmia) e nell'uomo.

La maggior parte dei modelli *ex vivo*, sfrutta uno strumento denominato Ussing Chamber, ideato già nel 1951 per lo studio del trasporto ionico transepiteliare in campioni di pelle di rana. Successivamente il sistema è stato riadattato da diversi gruppi di ricerca per la valutazione della permeabilità della mucosa intestinale e della sua capacità di trasporto, sia attivo che passivo, di alcune molecole di interesse. [39]

Per l'utilizzo della Ussing chamber (Figura 15) è necessario effettuare una biopsia del tratto enterico del quale si vogliono esplorare le peculiarità. Il campione viene, poi, aperto tramite

sezionamento per ottenere una superficie piana e viene posizionato all'interno della camera, fra due compartimenti che rappresentano il lato apicale e basolaterale.

Oltre alla cinetica di assorbimento di farmaci e molecole di origine alimentare, attraverso questo metodo è stata studiata la relazione fra il microbiota e l'integrità della barriera intestinale, prelevando campioni di mucosa colonica murina, successivamente posti in incubazione con il campione microbico. Sono, inoltre, stati esplorati gli effetti di infezioni batteriche causate da diversi patogeni e le possibili opzioni terapeutiche mediate da batteri benefici, con l'obiettivo di sviluppare probiotici efficaci.

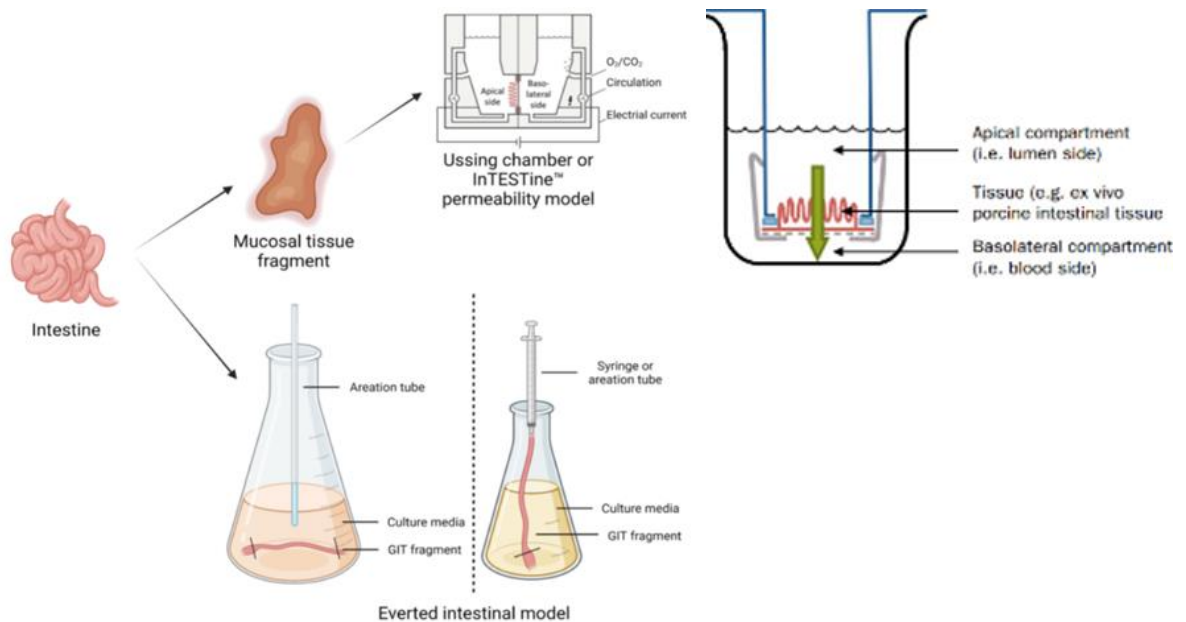


Figura 15 Utilizzo di tessuto prelevato dall'intestino per la generazione di modelli *ex vivo* attraverso l'utilizzo della Ussing chamber e dell' Everted intestinal model.

La semplicità della ussing chamber permette un buon grado di personalizzazione, in base alle necessità, per alloggiare tessuti di varie dimensioni; tuttavia, uno svantaggio è dato dalla difficoltà di preparazione del campione. Il tessuto, infatti, dopo l'asportazione deve essere introdotto nell'incubatore senza un eccessivo ritardo, per evitare eventi ischemici e il degrado del campione stesso. Inoltre, è necessario rimuovere gli strati di sierosa e quello muscolare al di sotto della mucosa, come è stato effettuato in studi su campioni porcini (successivamente sottoposti alla misurazione degli effetti di una infezione indotta del parassita *Ascaris suum*). Dopo un periodo di sole 3 ore all'interno del dispositivo il tessuto comincia a mostrare effetti di degrado e perdita di vitalità cellulare. [40] [41] Un adattamento della Ussing chamber è stato sviluppato dalla azienda TNO e commercializzato con il nome: inTESTine™ (Figura 15). Questo sistema high throughput a 24 pozzetti, sfrutta segmenti intestinali di maiale come campioni ed è stato creato ad hoc per l'esplorazione della fisiologia

intestinale. Inizialmente sfruttato per indagare il metabolismo degli SCFA è, successivamente, stato impiegato per una grande varietà di altri studi nel campo del funzionamento enterico. In particolare, anche grazie alla presenza di uno strato di muco e del microbiota, inTESTine™ permette di valutare accuratamente i processi di assorbimento e metabolismo delle sostanze somministrate, oltre a fornire dati predittivi sulle interazioni farmaco-farmaco o farmaco-eccipiente, riuscendo a differenziare la funzionalità di ogni specifico tratto intestinale. [42] [40]

Un ulteriore modello, sfruttato solo in pochi studi, è quello denominato “Everted intestinal ring”. Esso prevede l’immersione del tessuto intestinale asportato, in un terreno di coltura liquido ossigenato. Viene, quindi, iniettato all’interno del lume la soluzione contenente il composto di cui valutare l’assorbimento. Questo metodo si distingue per la sua semplicità e per la capacità di replicare il comportamento intestinale osservato *in vivo*. Tuttavia, la mancata asportazione di lamina propria e muscolaris mucosae rende tale modello inefficace nella corretta descrizione dei meccanismi di assorbimento, oltre a offrire un intervallo molto breve per effettuare i test, dopo il quale il tessuto perde la propria vitalità e attinenza con l’organismo nativo. [42]

I modelli intestinali *in vitro* sono i più diffusi prestandosi ad applicazioni molteplici. In particolare, vengono sfruttati per studi dei processi ADME, con l’obiettivo di riprodurre la complessità funzionale della mucosa intestinale.

Per ottenere un modello attendibile, tuttavia, sono necessarie alcune accortezze nella conservazione, e nella manipolazione delle cellule e nella scelta dei supporti appropriati. Per la generazione di un modello di laboratorio in grado di rappresentare l’intestino, gli elementi essenziali da riprodurre (riassunti in Figura 16 e quantificati nella Tabella 1) sono:

- ③ La presenza di tutti i fenotipi cellulari che popolano ogni strato della mucosa intestinale, così da simulare in modo ottimale le interazioni reciproche che intercorrono fra di esse e con l’ambiente circostante, tramite segnali fisici e biochimici. Inoltre, lo stato differenziato delle cellule in coltura deve permanere invariato per tutto il periodo dello studio. Una possibile opzione offerta dai modelli *in vitro* è quella di sviluppare co-colture con cellule appartenenti anche a linee cellulari differenti per ottenere una descrizione più accurata dei fenomeni fisiologici che hanno luogo a livello intestinale.

Lo studio dell’assorbimento di farmaci e composti chimici di origine alimentare, oltre alle possibili interazioni che possono avvenire fra molecole co-somministrate, richiede che le cellule in coltura raggiungano più rapidamente possibile uno stato di differenziamento ideale in modo da ottimizzare le tempistiche delle sperimentazioni. Dovendo testare una grande quantità di molecole in campo industriale, anche l’utilizzo di risorse, come i reagenti dei terreni

di coltura e i fattori di crescita, deve essere limitato il più possibile con l'obiettivo di contenere i costi. Tali risultati possono essere ottenuti con metodi di coltura accuratamente studiati. [6]

④ L'attività di cross-talk che avviene fra epitelio, sistema immunitario e microbiota intestinale, la cui funzione modulatoria nei confronti della biochimica dell'ambiente intestinale (soprattutto per quanto riguarda il tratto del colon) si è dimostrata alla base di diversi processi infiammatori e di alterato assorbimento. [6] [27]

④ La formazione un substrato morfologicamente simile a quello intestinale, con la presenza di villi (con altezze più simili possibili a quelle fisiologiche di 0,5-1 mm e una densità di 10-40 unità per cm^2), cripte e nicchie sui quali coltivare il materiale cellulare. La ECM (Extracellular Matrix), di cui la lamina propria è il componente preponderante, inoltre, deve rispettare la composizione chimica e il comportamento meccanico riscontrato *in vivo*.

È stato dimostrato che, come le concentrazioni di specifici fattori di crescita e molecole di segnale lungo l'asse cripta-villo, variano anche le caratteristiche della ECM. Essa è principalmente composta di fibronectina, laminina e collagene IV. Quest'ultimo elemento presenta una distribuzione costante in tutta la ECM. La laminina, invece, si presenta in quantità maggiore nel suo sottotipo $\alpha 2$ lungo il villo, mentre nelle cripte sono maggiormente espressi i sottotipi $\alpha 3$ e $\alpha 5$ e la fibronectina ricopre un ruolo predominante. [16]

Queste differenze portano necessariamente a disparità evidenti nel comportamento meccanico delle diverse zone della mucosa e tale aspetto sembra essere un fattore guida per la modulazione della staminalità e differenziamento epiteliale.

Lo studio delle caratteristiche meccaniche della mucosa risulta difficoltoso *in vivo* a causa delle limitazioni tecniche riscontrate e del carattere invasivo dell'indagine, mentre procedure di imaging come l'MRI, per quanto non invasive, sono in grado di individuare solamente alterazioni macroscopiche nel tessuto.

Perciò le misurazioni vengono effettuate preferibilmente *ex vivo*, malgrado la difficoltà nella manipolazione e nel testing di campioni di piccole dimensioni (sotto il centimetro) attraverso attrezzature ordinarie. [27]

In alcuni studi è stato quantificato il modulo di Young (rigidezza) della mucosa, rilevando un valore che va da $0,5 \div 1$ kPa fino a 2,9 kPa in individui sani, ma che si rivela nettamente maggiore, fino a 16 kPa, in pazienti affetti da IBD. Non è ancora chiaro se questo incremento sia dovuto alle formazioni fibrose causate dalla patologia o se l'aumento stesso del modulo di Young sia uno dei fattori che precedono l'acutizzarsi della sintomatologia.

Sono state, inoltre, messe in evidenza una maggiore espressione di collagene nei casi di irrigidimento mucosale e una scarsa capacità traslazionale da modelli animali all'uomo. Rispetto a quella umana la mucosa intestinale murina risulta nativamente più rigida, mentre quella suina, pur riproducendo più efficacemente le caratteristiche desiderate, non mostra una fedele risposta alle modifiche indotte da patologie infiammatorie. Ciò rivela come siano necessari modelli *in vitro* con substrati meccanicamente accurati, in particolare per l'esplorazione degli stati alterati del tratto GI. [16] [43]

④ Per simulare il flusso presente nel lume e che è causa di uno stress di taglio sul lato apicale delle cellule, è necessario l'utilizzo di un sistema fluidico.

Lo stress di taglio misurato sulle pareti intestinali, causato dal flusso luminale si attesta attorno a $\sim 0,002 \div 0,08 \text{ dyne/cm}^2$ ($0,0002 \div 0,008 \text{ Pa}$). Questi valori, tuttavia, sono soggetti ad una grande variabilità a causa di fattori come lo stato nutrizionale, la modulazione del SNE e la viscosità del fluido all'interno del lume. In fase post-prandiale il flusso a livello dell'ileo, varia da $0,73$ a 3 ml/min , mentre nel digiuno può raggiungere i $2,35 \text{ ml/min}$, dipendentemente dal contenuto del pasto, con onde pressorie che oscillano fra 20 e 24 mmHg ($2,7 \div 3,2 \text{ kPa}$). [16] [27] [44] [45]

Gli spostamenti di fluido causati dalle contrazioni dei fasci mioenterici longitudinali e circolari, tuttavia, non sono continui, ma hanno un andamento pulsatile. Il pattern di contrazione è complesso e non ancora totalmente compreso e ciò causa un ulteriore aumento della complessità del modello, in cui si alternano fasi di flusso laminare e turbolento. [43]

Per riprodurre tale aspetto si rivela necessario l'utilizzo di materiali di supporto alla coltura che rispettino anche le caratteristiche di flessibilità e deformabilità della lamina propria; mansione per la quale la maggior parte dei substrati rigidi comunemente utilizzati non è adatta. L'attività di peristalsi fisiologica, caratterizzata da $7 \div 20$ onde peristaltiche al minuto, può essere simulata attraverso l'applicazione di cicli di deformazione al supporto della coltura cellulare del $8-10\%$, con una frequenza di $0,15 \text{ Hz}$. Durante i periodi di digiuno le contrazioni della parete, tuttavia, si rivelano maggiormente discontinue e raggiungono un picco di intensità in corrispondenza della fase III del MMC (migrating motor complexes). [27] [46]

Molti materiali sono stati testati alla ricerca di un risultato soddisfacente, che promuovesse la vitalità, il differenziamento e la proliferazione cellulare. Fra essi in letteratura sono annoverati supporti di origine naturale in collagene o Matrigel e altri di natura artificiale (come il PEG). Questi ultimi si sono rivelati più versatili e maggiormente controllabili nelle proprietà meccaniche e chimico-fisiche, avendo una struttura ben definita. Tuttavia, offrono anche una scarsa bioattività e capacità di adesione alle cellule, oltre a non essere, per la maggior parte, biodegradabili. Nuovi studi si sono, quindi, rivolti verso hydrogel semi-sintetici o bioibridi. [16]

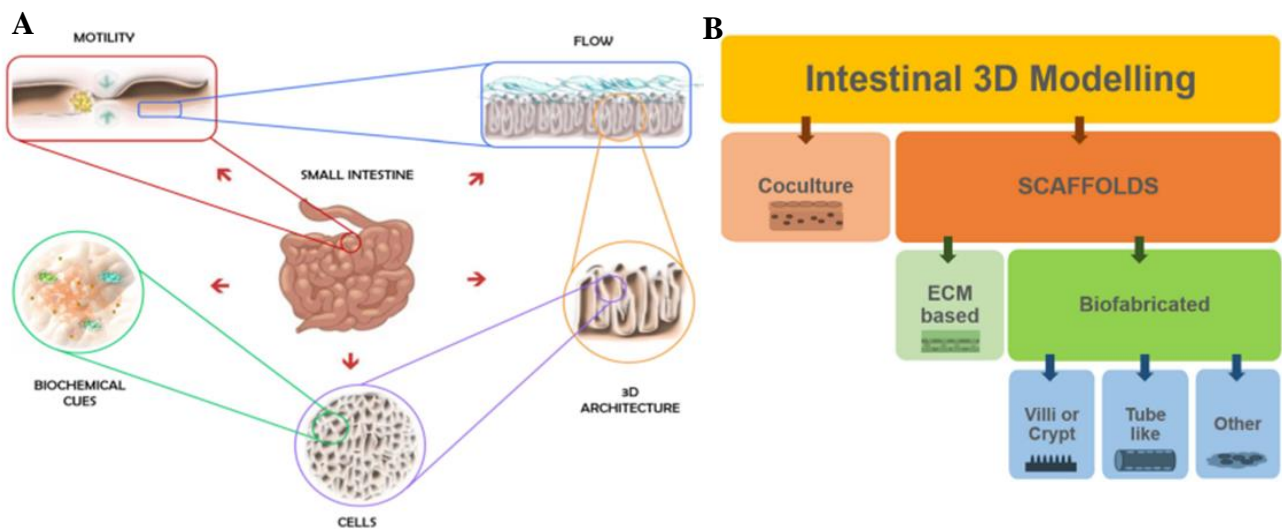


Figura 16 (A) schema dei fattori fisico/morfologici (architettura 3D, movimenti di segmentazione, flusso) e biochimici (fattori di crescita, citochine) che influenzano la corretta riproduzione *in vitro* delle caratteristiche intestinali. (B) schema a blocchi della modellazione dell'intestino attraverso la co-coltura su scaffold in biomateriale che riproponga le caratteristiche morfologiche salienti dell'ambiente fisiologico, al quale dovrà essere aggiunto il supporto di stimoli dinamici prodotti da un bioreattore.

Tabella 1: Parametri di rigidità, stress di taglio, deformazione e altezza e densità dei villi, in condizioni fisiologiche dell'intestino.

Stiffness	Shear stress	Strain	Villi
0.5–1 kPa	0.0002–0.008 Pa	8–10% at 0.15Hz	Density: 10–40 mm ² ; Height: 0.5–1 mm

2.5 Cellule Caco-2

I modelli rappresentano i modelli *in vitro* più semplici e utilizzati per la loro facilità di coltura e conservazione, oltre che per il costo contenuto. Possono essere sfruttate diverse linee immortalizzate o di origine cancerosa, malgrado presentino alcuni difetti che hanno spinto alcuni studiosi a preferire modelli basati su cellule primarie o iPSCs (induced pluripotent stem cells).

Nell'ambito dei modelli cellulari legati al sistema enterico, le sorgenti dalle quali è possibile recuperare le cellule possono essere molteplici e vengono selezionate in base alle disponibilità e all'obiettivo dello studio (Figura 17).

Dall'intestino è possibile isolare cellule staminali per la produzione di organoidi o enteroidi, oppure cellule primarie adulte e differenziate. Da tumori intestinali è, invece, possibile raccogliere cellule che, grazie alle loro particolari caratteristiche di auto rinnovamento e continua replicazione, possono essere mantenute in vita anche per anni in linee cellulari continue. Un metodo alternativo per ottenere quest'ultimo tipo di cellule, particolarmente poco costoso, è quello di sottoporre le cellule intestinali primarie ad un processo di immortalizzazione, attraverso una mutazione genica di natura oncogena.

Una volta ottenute le cellule è possibile seminarle, con l'opportuno terreno di coltura arricchito di un cocktail di fattori di crescita, nutrienti e antibiotici, sul supporto selezionato, che può essere 2D (tipicamente piastre o Transwell) o 3D, per effettuare le indagini desiderate. Diverse linee cellulari possono essere poste in co-cultura per ottenere un modello più complesso e dettagliato. [42]

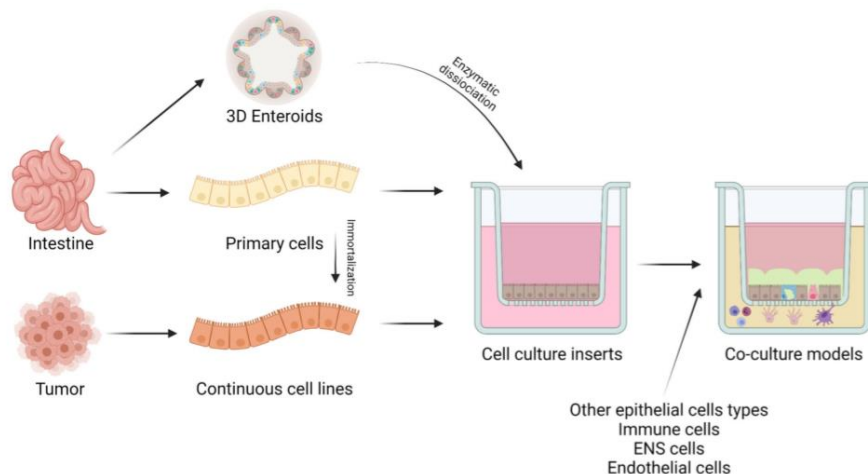


Figura 17 Diversi metodi per ottenere colture *in vitro*. Dall'intestino possono essere isolati enteroidi o cellule primarie. Da queste ultime è possibile ricavare colture cellulari all'interno di inserti standard o possono subire un processo di immortalizzazione per divenire linee cellulari continue. Nei supporti più avanzati di coltura è possibile aggiungere diversi componenti fisiologici aggiuntivi come cellule epiteliali, immunitarie, nervose o endoteliali.

La linea cellulare Caco-2 rappresenta il gold standard sfruttato dalle maggiori aziende farmaceutiche nello studio predittivo dell'assorbimento, a livello intestinale umano, di molecole

terapeutiche e alimentari. Si tratta di una linea cellulare derivante da cellule epiteliali umane di adenocarcinoma del colon retto, isolate dai tessuti di un uomo di 72 anni e sviluppata nel 1975 da Jorgen Fogh allo Sloan-Kettering Institute for Cancer Research. [47] [48]

La caratteristica che ha reso questo modello così popolare nei laboratori è la capacità di tali cellule di differenziarsi e raggiungere la confluenza spontaneamente, in condizioni standard di coltura. Malgrado la loro origine colonica, le cellule Caco-2 sono in grado di assumere un fenotipo tipico dell'epitelio caratteristico dell'intestino tenue, formando un monostrato polarizzato (con una netta differenza morfologica e funzionale fra lato apicale e basolaterale) completo di giunzioni strette fra cellule adiacenti, trasportatori, enzimi normalmente espressi sull'orletto a spazzola (come idrolasi e sucralasi-isomaltasi) e microvilli delle stesse dimensioni di quelli osservati *in vivo*.

Il differenziamento delle cellule Caco-2 inizia una volta che la coltura ha raggiunto la confluenza, dopo circa 7 giorni dalla semina e viene completata nell'arco di 21 giorni, con la piena acquisizione del fenotipo desiderato, che riprende le caratteristiche salienti degli enterociti. La somiglianza morfologico-funzionale con le cellule epiteliali umane del tenue aumenta con tempi di coltura più prolunganti. Inoltre, un numero maggiore di passaggi della coltura porterà alla selezione delle cellule in grado di crescere più velocemente e che formeranno un monolayer con giunzioni più solide e una differente espressione di trasportatori transcellulari. [6] [17]

2.5.1 Condizioni di coltura standard

A causa dei fattori che possono provocare differenze importanti fra colture di Caco-2 trattate con procedure non esattamente sovrapponibili in termini di tempistiche e sostanze utilizzate nei terreni di coltura, i risultati ottenuti con il loro impiego da diversi laboratori potrebbero dimostrarsi discordanti. Si rivela, perciò, necessaria una precisa standardizzazione del trattamento della coltura.

Un possibile protocollo è stato delineato in diversi studi e prevede la semina delle cellule in un medium standard contenente DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), arricchito con siero bovino fetale (10%), amminoacidi non essenziali e antibiotici (penicillina e streptomina). Le cellule sono seminate a concentrazioni specifiche e mantenute ad una temperatura di 37°C in atmosfera al 5% di CO₂ e umidità relativa del 90%. Tali condizioni ambientali devono essere mantenute costanti per tutto l'arco della coltura, all'interno di un incubatore.

Per valutare la vitalità iniziale delle cellule Caco-2, la procedura prevede la semina su piastre Petri di 9,2 cm² di area con una densità di 2×10^5 cellule/cm². Dopo un periodo di coltura di 24 ore può già essere aggiunto, eventualmente, un composto di interesse (del quale si vuole valutare

l'influenza sulle cellule) al terreno, che viene lasciato in incubazione per 2 ore. Infine, per verificare la quantità di cellule vitali viene effettuata una ulteriore incubazione con 0,4% di Trypan blue per 5 minuti, che permetterà di procedere con la conta attraverso una ispezione in microscopia. [47]

2.5.2 Transwell

Uno dei supporti più sfruttati per la coltura delle cellule Caco-2 è il Transwell® (Figura 18). Questo dispositivo si è rivelato, in una grande quantità di studi, la soluzione più efficace, immediata e dal costo minore per effettuare studi di permeabilità e assorbimento intestinale *in vitro*. La struttura del Transwell® permette la semina delle cellule (sia di quelle ancoraggio dipendenti che di quelle ancoraggio-indipendenti) sulla membrana porosa di un inserto. Quest'ultimo, una volta assemblato all'interno del pozzetto separerà i due compartimenti del Transwell®, che simuleranno il lato apicale, superiore, denominato donatore (che rappresenta il lume) e quello basolaterale, inferiore, detto ricevente (che prende il posto dei capillari sanguigni).

A



B

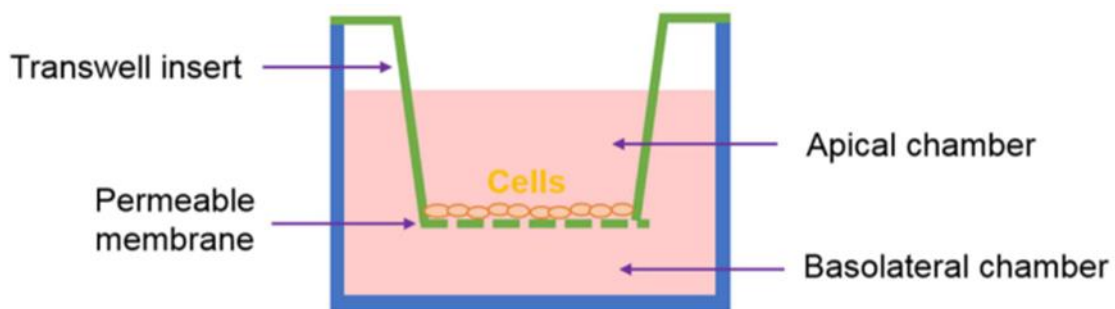


Figura 18 (A) Multipiastra che ospita diversi Transwell con inserti rimovibili. **(B)** Schema di un singolo Transwell dove è mostrata la camera apicale e quella basolaterale separate dalla membrana permeabile popolata dalle cellule in coltura.

Con questa configurazione sarà possibile accedere ad entrambi i compartimenti con facilità, permettendo ai ricercatori di studiare il comportamento del monolayer in risposta ai composti in fase di analisi.

La comune pratica di utilizzo del Transwell® prevede, inizialmente, il riempimento dei pozzetti della piastra multiwell con il medium. Successivamente sono applicati gli inserti e vengono addizionati il medium e le cellule nel compartimento apicale. Per migliorare la capacità di ancoraggio delle cellule, prima della semina è possibile incubare multiwell e inserti addizionati di medium, per un periodo che va da un'ora ad una notte, alla temperatura alla quale avverrà la crescita cellulare (all'interno dell'incubatore), per poi addizionare le cellule stesse. Per migliorare l'accessibilità al lato basolaterale, inoltre, sono presenti tre aperture negli inserti, attraverso le quali, sarà possibile inserire la pipetta per estrarre il medium arricchito dei metaboliti cellulari.

La membrana dell'inserto può essere composta di diversi materiali, principalmente poliestere (PET), policarbonato (PC) o Politetrafluoretilene rivestito di collagene (PTFE-COL). Tutti e tre i materiali sono studiati per promuovere la crescita e l'adesione cellulare, ma l'inserto in PET offre la migliore visibilità cellulare, che risulta scarsa in quelli di PC, mentre quello in PTFE-COL permette la visualizzazione dei soli contorni cellulari. Quest'ultimo materiale, inoltre, risulta particolarmente fragile, ma le fibre di collagene addizionate (di tipo I e III derivate da placenta bovina) permettono un'adesione ottimale del monolayer senza intaccare la porosità della membrana.

Proprio la porosità dell'inserto è uno dei fattori chiave nello studio della permeabilità del monolayer e deve essere selezionata (in un range di diametro dei pori che va da 0,4 a 8 µm) in base allo studio da effettuare e alla specifica modalità di coltivazione poiché, con pori troppo larghi, alcune cellule potrebbero migrare verso il compartimento basolaterale, mentre con pori dal diametro troppo piccolo possono verificarsi fenomeni di ritenzione delle molecole a livello della membrana. [49]

Malgrado gli ottimi risultati ottenuti con il Transwell® va considerato che questo metodo rappresenta una grossolana approssimazione della morfologia intestinale tridimensionale, poiché incapace di rappresentare fedelmente l'organizzazione epiteliale fisiologica, caratterizzata da cripte e villi. Inoltre, nelle colture statiche su Transwell®, sono assenti le forze impresse sulle cellule dalle contrazioni muscolari peristaltiche e segmentali e dal flusso luminale, oltre alle interazioni fisiche e biochimiche fra ECM e materiale cellulare. [6]

Dalla sezione prossimale a quella distale, inoltre, il pH del lume intestinale subisce variazioni considerevoli per agevolare l'assorbimento epiteliale di specifici nutrienti. Tale variazione è mediata dalla secrezione di soluzioni tampone come, ad esempio, il succo pancreatico, che contrastano l'acidità del chimo. Una simile caratteristica fisiologica, tuttavia, non è facilmente riproducibile *in vitro*, poiché

i compartimenti del Transwell® sono mantenuti a pH costante pari a 6,5 e 7,4 per, rispettivamente, il lato apicale e quello basolaterale. La stabilità della condizione di acidità dei compartimenti previene modifiche impreviste nella citoarchitettura del monolayer, ma rende impossibile la distinzione della zona fisiologica intestinale a livello della quale saranno maggiormente assorbiti i farmaci e le molecole analizzati.

Un ulteriore fenomeno che può rendere il Transwell® particolarmente impreciso nei risultati forniti è quello della cacofilia, ovvero la tendenza di alcuni farmaci a legarsi in modo reversibile alle membrane delle cellule Caco-2, riscontrabile soprattutto per molecole lipofile. L'impatto della cacofilia può essere influenzato dalla concentrazione della molecola in esame nei due compartimenti e dalla area di superficie del monolayer interposto. Il fenomeno della cacofilia è estremizzato in studi a basse concentrazioni, che prevedono la miniaturizzazione del Transwell® [50]

Possono, inoltre, essere presenti casi di legame non specifico fra farmaco e la membrana in materiale plastico dell'inserito del Transwell®, minando l'accuratezza del dato di permeabilità raccolto al termine dell'analisi. Per minimizzare tale avvenimento è possibile aggiungere BSA (concentrazione 1-4%) al compartimento ricevente, ma tale espediente ha effetto solamente sulle molecole altamente lipofile. Una ulteriore strategia è quella di registrare la composizione del terreno di coltura all'interno di entrambi i compartimenti per valutare la sottostima dei risultati, estrapolando la quantità di molecola in esame rimasta intrappolata nel monolayer o nella membrana porosa. Entrambi i metodi, però, richiedono costi maggiori e tempi di lavorazione più lunghi, oltre all'impiego di strumenti più sofisticati. [47] [50]

2.5.3 TEER

Per la valutazione dell'integrità del monolayer, oltre allo stato di differenziamento cellulare vengono utilizzati diversi metodi di ispezione e testing, che si avvalgono dell'utilizzo di biomarker specifici.

Uno degli esami maggiormente applicati alle colture epiteliali è quello della valutazione del TEER (Trans epithelial Electrical Resistance). Questo parametro fornisce una panoramica diretta dell'integrità strutturale dello strato cellulare e dello sviluppo delle giunzioni strette fra le cellule.

Il TEER è rilevato fornendo, con degli elettrodi, una corrente nota (I) attraverso l'epitelio e registrando la differenza di potenziale (V) che si genera a causa dell'ostacolo cellulare interposto (Figura 19A). Con questo dato sarà, quindi, possibile calcolare la resistenza opposta dall'epitelio attraverso l'applicazione della legge di Ohm: $V = R \times I$. Più la resistenza R sarà alta, più le giunzioni strette

saranno sviluppate fra cellule adiacenti. Il TEER è, inoltre, correlato alla superficie epiteliale studiata, perciò viene misurato in Ωcm^2 . [51] [52]

La corrente può essere fornita con due metodologie distinte: in continua o in alternata. Nel primo caso, tuttavia, si corre il rischio di causare un danno alle cellule e la polarizzazione degli elettrodi. Utilizzando una corrente alternata, è possibile evitare queste problematiche ed estrapolare una maggiore quantità di informazioni dal test stesso. L'epitelio, infatti, può essere elettricamente visto come un circuito che comprende sia componenti capacitive che resistive (Figura 19B). Queste ultime, a basse frequenze (<5 kHz), non permettono il passaggio di corrente, comportandosi come circuiti aperti mentre, aumentando la frequenza, le capacità diventano sempre più conduttive, aggiungendo il loro contributo al TEER. In questo modo è possibile monitorare, oltre all'integrità della barriera, l'adesione, la migrazione e i micro-movimenti cellulari. [51]

Il sistema di rilevamento più utilizzato per il TEER è il *EVOM* (Epithelial VoltOhmMeter), che sfrutta due elettrodi a bacchetta con i quali fornisce una corrente alternata alla frequenza di 12,5 Hz e con un'ampiezza di 10 μA . Questo strumento è, successivamente, stato sostituito dall'*EVOM²*, che sfrutta quattro elettrodi per effettuare la misura ad istanti discreti. [45]

Alcuni dei problemi di questo sistema, tuttavia, sono stati riscontrati nella non uniformità del campo elettrico prodotto, che può portare ad una misura imprecisa e dipendente dalla posizione degli elettrodi al di sopra del materiale cellulare. Inoltre, essendo le colture standard prevalentemente statiche, il passaggio netto di soluti fra i due compartimenti può causare la formazione di strati di fluido con concentrazioni differenti, che influiscono sulla misura del TEER. [53]

Esponendo gli elettrodi a un flusso, invece, si corre il rischio di ottenere degli artefatti dovuti al movimento ionico attorno ad essi. [45]

Il supporto stesso dell'inserito può dare un contributo non trascurabile alla misura del TEER perciò, in certi casi, può essere consigliabile valutare la resistenza nel Transwell in assenza della componente cellulare, per poi sottrarre tale valore a quello ottenuto in sua presenza.

Inoltre, a causa dell'applicazione di corrente alternata, la componente resistiva del monolayer viene in parte cortocircuitata, portando a una sottostima della resistenza epiteliale effettiva. Quest'ultima mostra anche una dipendenza dalla temperatura, perciò gli elettrodi devono essere sottoposti ad un costante controllo tramite appositi sensori per effettuare misure prolungate. [53]

In alternativa all'utilizzo di elettrodi controllati manualmente, è stato sviluppato un sistema automatizzato denominato *cellZscope* (Figura 19C), in grado di esaminare il valore di TEER di cellule in coltura sulle membrane porose degli inserti standard. Questo strumento sfrutta il principio della spettroscopia di impedenza, in cui la frequenza della tensione alternata somministrata viene fatta

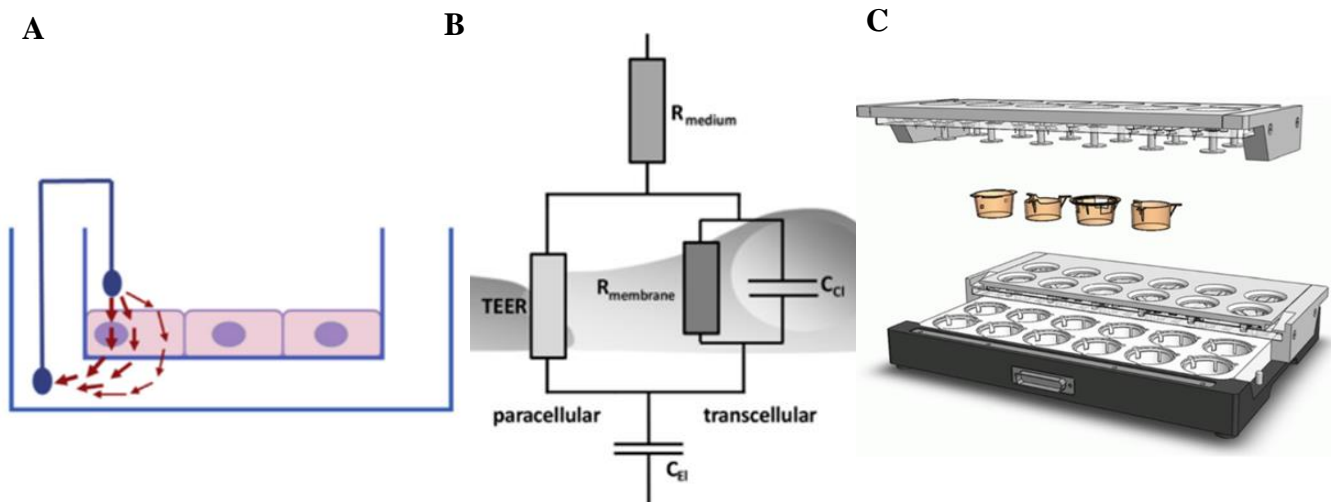


Figura 19 (A) Modalità di misura del TEER attraverso due elettrodi posizionati ai lati opposti del monolayer, fra i quali viene fatta scorrere la corrente. **(B)** Analogo elettrico del monolayer, dove R_{medium} è la resistenza offerta dal terreno di coltura, $R_{membrana}$ è la resistenza offerta dalla membrana, mentre il TEER rappresenta la resistenza della via paracellulare. Le capacità C_{Cl} e C_{EI} rappresentano, rispettivamente, quelle offerte dalla cellula e dall'elettrodo di misurazione. **(C)** Schema del dispositivo CellZscope che permette di misurare automaticamente e in modo continuo il TEER all'interno di colture standard con un design in grado di ospitare da 6 a 24 inserti.

variare in un range di valori misurando, per ognuno di essi, la fase e l'ampiezza della corrente alternata risultante. La spettroscopia di impedenza si rivela un metodo affidabile e non invasivo per la valutazione dell'impedenza totale del monolayer, che comprenderà sia il valore di resistenza, che quello di capacitivo del materiale cellulare.

Il cellZscope, in particolare, fornisce uno stimolo sinusoidale a 45mV e restituisce in uscita i valori di TEER, capacità e resistenza dello strato cellulare. Il valore capacitivo registrato si è rivelato un buon indicatore per il monitoraggio dello sviluppo delle estroflessioni cellulari apicali (microvilli). Fra i principali vantaggi del cellZscope possono essere annoverati la capacità di alloggiare una grande quantità di inserti standard (da 24, 12 o 6-well) senza la necessità di dispositivi aggiuntivi e ciò lo rende un valido strumento per il controllo dello stato delle colture e la valutazione degli effetti delle molecole in fase di studio, su di esse. [51] [52] [54]

Alla luce delle varie misurazioni effettuate in diversi studi, il valore di TEER delle cellule Caco-2 esprime un plateau a $234 \Omega cm^2$, mentre è stato stimato che quello dell'epitelio del tenue si aggira attorno ai $25-40 \Omega cm^2$. Ciò indica una sovraespressione di giunzioni strette nella linea cellulare immortalizzata rispetto all'epitelio in condizioni fisiologiche; mentre risulta maggiormente accurato per la modellazione del colon, dove il TEER può raggiungere i $300 \Omega cm^2$ *in vivo*. Il valore di TEER presentato dalle cellule Caco-2, tuttavia, ha dimostrato una enorme variabilità fra diversi studi laboratoriali, spaziando da 80 a $1420 \Omega cm^2$. [50] [55]

Tabella 2: Misurazione del TEER in alcune colture cellulari, attraverso diversi dispositivi.

Cell or Tissue	TEER ($\Omega \cdot \text{cm}^2$)	Equipment used	Cell or Tissue	TEER ($\Omega \cdot \text{cm}^2$)	Equipment used
Small Intestine (<i>ex-vivo</i>)	50–100	Ussing chamber	IPEC-J2	7,000–8,000	Millicell-TERS-electrode
Colon (<i>ex-vivo</i>)	300–400	Ussing chamber	IPEC-1	6,000–7,000	Millicell-TERS-electrode
Caco-2	1,100–1,350	Millicell-ERS system	PoCo83–3	4,000–6,000	EVOMX ohmmeter
Caco-2/HT29-MTX	100–300	Millicell-ERS system	Bovine colonoid monolayer	300–400	Chopstick-electrode epithelial voltohmmeter EVOM2
Caco-2/Raji B	80–100	Millicell-ERS system	Porcine enteroid monolayer	1,000–1,150	cellZscope®
Caco-2/HT29-MTX/Raji B	50–70	Millicell-ERS system	Primary cIECs	50–70	Millicell-ERS system
Caco-2/THP-1	80–100	Millicell-ERS system			
Caco-2/PC12	80–100	Millicell-ERS system			

2.5.4 Assays molecolari

Oltre al monitoraggio delle caratteristiche elettriche del monolayer può essere sfruttata una grande quantità di molecole per valutare la permeabilità epiteliale *in vitro*. Per quanto la misurazione del TEER sia un metodo rapido ed efficace per stimare l'integrità del monolayer, è stato dimostrato che esso è influenzato anche da fattori diversi da quelli che determinano la permeabilità paracellulare.

Quest'ultima, infatti, è un indice della capacità di molecole più grandi di attraversare l'epitelio, mentre il TEER si basa solamente sul passaggio paracellulare di flussi ionici. Le porosità che permettono il passaggio di tali molecole, tuttavia, rappresenta una ulteriore discrepanza fra le cellule Caco-2 e l'ambiente intestinale *in vivo*. Il raggio delle porosità si attesta attorno $9,0 \pm 0,2 \text{ \AA}$ a livello intestinale, mentre nelle cellule Caco-2 è stato stimato essere circa $3,7 \pm 0,1 \text{ \AA}$, generando necessariamente una discrepanza fra la permeabilità presentata dal modello (fortemente limitata) e quella dell'organismo nativo. [50]



Una delle molecole più sfruttate per l'analisi della permeabilità paracellulare è il ^{14}C – *mannitolo*: un composto idrofilo (perciò impermeabile alle membrane lipidiche cellulari), che presenta un peso molecolare di 182 Da e un raggio di 4.1nm. Il ^{14}C – *mannitolo*, per il transito transepiteliale, sfrutta i pori acquosi nei complessi giunzionali stretti e la sua permeabilità è bassa: minore di 0,5% all'ora. Un valore molto maggiore di quello atteso, riscontrato sperimentalmente, può essere un indicatore di diminuita integrità del monolayer. Una molecola

dalle proprietà simili, sfruttata in alternativa al ^{14}C – *mannitolo*, è l'inulina: un oligosaccaride naturalmente presente in diversi alimenti. [42] [47]

⑤ Il Lucifer yellow sfrutta la diffusione passiva per attraversare il monolayer tramite la via paracellulare. Ha una dimensione di 444 Da ed è ampiamente sfruttato in virtù delle sue proprietà ottiche, che ne permettono l'eccitazione, tramite microscopia a fluorescenza, irraggiandolo con una fonte luminosa a 424 nm di lunghezza d'onda. L'emissione avverrà a 525 nm, nello spettro del giallo. Il Lucifer yellow è stato utilizzato anche in diversi studi *in vivo*. Un passaggio transepiteliale di più del 5% di Lucifer yellow è considerato un indicatore di eccessiva permeabilità della barriera. [42] [56]

⑤ Il Destrano-4000 è uno zucchero dal peso molecolare di 4 kDa, al quale viene legata una molecola di FITC (fluoresceina isotiocianato), un fluorocromo in grado di renderlo visibile ad un'ispezione in microscopia di fluorescenza. Il FITC-Destrano-4000 è stato utilizzato ampiamente come sostituto di altri composti legati a sonde radioattive sia *in vitro*, che *ex vivo* e *in vivo*. Il FITC è stato, inoltre, applicato come indicatore fluorescente su nano-particelle per la valutazione della permeabilità epiteliale. [45]

⑤ Altre sonde molecolari sono i polimeri della famiglia dei polietilen-glicoli (PEG). Essi sono analizzabili in spettroscopia di massa e possono essere prodotti con varie dimensioni che vanno dai 400 ai 4000 Da. Ciò permette di valutare la permeabilità epiteliale rispetto a molecole di diversi pesi molecolari.

⑤ I metodi per valutare la permeabilità transcellulare, sfruttano a loro volta diverse particelle polimeriche legate a indicatori fluorescenti. La dimensione ottimale di tali particelle per studi *in vitro*, si aggira attorno a 0,5-1 μm , contro ai 2-5 μm consigliabili per gli studi *ex vivo*. Anche alcuni batteri (sia vitali, che morti) sono stati utilizzati per valutare l'uptake intracellulare di cellule *in vitro*, dimostrandosi un mezzo valido grazie alle loro differenti dimensioni, forme e interazioni funzionali che possono offrire. [42]

Queste tecniche molecolari per la valutazione della permeabilità sono sfruttate per ottenere un dato comune e comparabile, individuato della P_{app} (Permeabilità apparente), comunemente calcolata in cm/s come:

$$P_{app} = \frac{\partial Q}{\partial t} \times \frac{1}{A \times C_0}$$

Dove $\frac{\partial Q}{\partial t}$ indica il rateo di permeabilità, ovvero la quantità del composto in esame riscontrata nel compartimento ricevente in funzione del tempo, misurata in nmol/s . Mentre A indica la superficie del

monolayer espressa in cm^2 e C_0 è la concentrazione iniziale della molecola nel compartimento donatore misurata in $nmol/ml$. [47] [55]

Altri test possono essere rilevanti per raccogliere informazioni riguardo al differenziamento cellulare, come quelle della fosfatasi alcalina. L'espressione di questo biomarker può essere valutata già nei primi giorni della coltura (2-3 giorni dopo la semina) e un suo valore elevato è associabile ad uno scostamento del fenotipo cellulare verso quello degli enterociti maturi.

È, inoltre, possibile valutare l'entità dell'attività metabolica delle cellule attraverso l'MTT assay. L'MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) viene ridotto in caso di elevata attività mitocondriale (a cui è associata la presenza dell'enzima deidrogenasi) e la sua colorazione vira verso il colore blu/viola, indicando la vitalità cellulare. [57]

Infine, per avere completa panoramica sull'attività cellulare in risposta alle molecole testate, è possibile effettuare analisi come dosaggi ELISA e qPCR, valutando l'espressione genica del campione. [42]

2.5.5 Supporti di coltura 3D e dinamici per Caco-2

Come evidenziato in precedenza, il Transwell® si è rivelato un supporto efficace e largamente sfruttato nel corso degli anni per il trattamento di modelli cellulari; ma presenta alcune mancanze, soprattutto a livello morfologico e funzionale, che hanno spinto molti ricercatori a sviluppare supporti più articolati su cui effettuare la semina cellulare, per meglio rappresentare la fisiologia intestinale.

In particolare, sono stati sviluppati modelli che presentano un'architettura tridimensionale per mimare la forma di villi e cripte. Altri hanno implementato un regime di coltura dinamico, attraverso l'applicazione di un flusso in grado, a sua volta, di provocare uno stress di taglio sulle cellule: condizione fisiologicamente più attendibile rispetto alla coltura statica.

Gli strumenti sviluppati indirizzare e coadiuvare la crescita e la sopravvivenza cellulare, sono denominati bioreattori.

Un primo esempio ha proposto l'utilizzo di una struttura a fibre porose per la costruzione di uno scaffold che potesse accelerare la crescita e il differenziamento delle cellule Caco-2, simulando la morfologia intestinale (Figura 20). In questo studio, le proprietà acquisite dalla coltura sono state comparate fra supporti a fibre porose di diversi materiali, tra i quali PES (polietilensulfone), PSF (polisulfone) e PAN (poliacrilonitrile). Lo scaffold in PES ha permesso una crescita e un differenziamento cellulare più rapide rispetto agli altri prototipi e alle cellule coltivate su membrane

2D in PES (con superficie liscia o ruvida). Il risultato indica come l'ambiente, seppur statico, abbia incentivato lo sviluppo citologico.

In particolare, il differenziamento è risultato accelerato fra i 4 e i 10 giorni di coltura. Per la validazione di tale effetto sono stati presi, come marcatori, la formazione delle giunzioni strette, l'espressione degli enzimi dell'orletto a spazzola e del trasportatore P-gp. Quest'ultimo è notoriamente sottoprodotto dalle cellule Caco-2 rispetto a quelle intestinali mentre, attraverso l'utilizzo dello scaffold in PES, i livelli di P-gp attivo sono risultati molto maggiori.

Sfruttando questo supporto la rapidità evolutiva della coltivazione *in vitro* si avvicina, così, a quella fisiologica degli enterociti, che comunemente si attesta attorno ai 3-4 giorni (per la completa maturazione) e fornisce uno strumento predittivo adeguato per i processi di assorbimento intestinale.

Il successo dell'esperimento può essere imputato, secondo gli autori, alla geometria curva delle fibre porose in PES, che riproduce in modo ottimale la parete intestinale, fornendo anche stimoli meccanici grazie alla maggior espressione di F-actina (proteina di ancoraggio cellulare), rispetto alle culture su Transwell. [58]

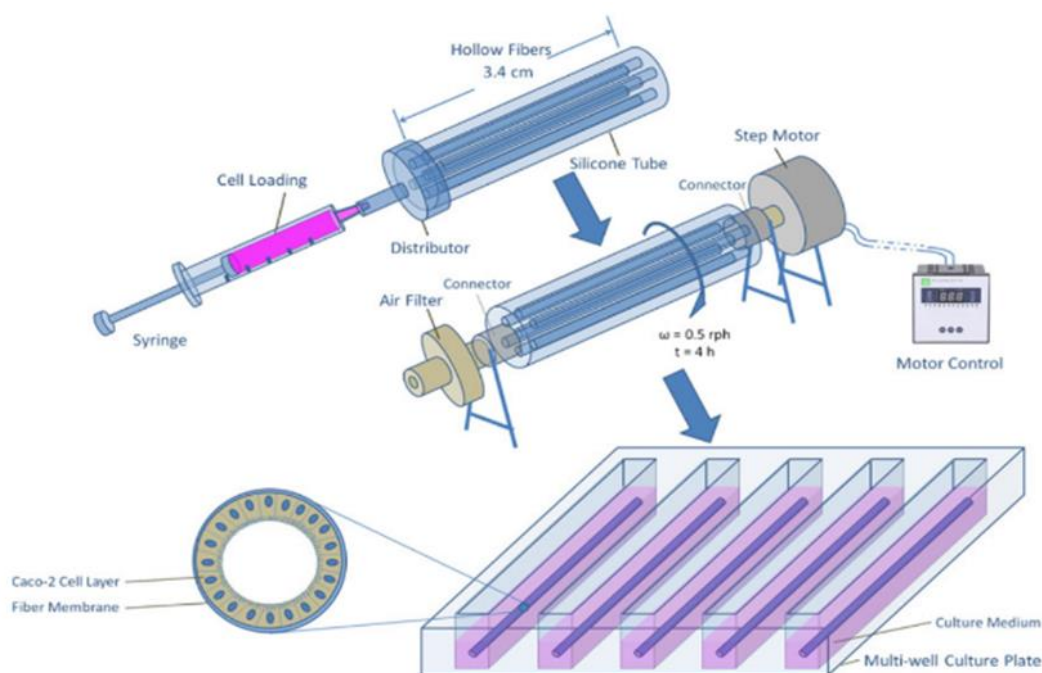


Figura 20 Processo di produzione dello scaffold a fibre porose in PES. I tessuti fibrosi vengono, inizialmente, caricati con le cellule attraverso una siringa e, successivamente, il cilindro in silicone che li contiene è posto in rotazione, sfruttando un motore passo-passo, per 4 ore. Infine, le singole fibre cave sono poste in well distinti riempiti con il terreno di coltura.

Altri approcci sono stati introdotti per riprodurre l'architettura 3D, in grado di fornire il giusto ambiente alle cellule *in vitro*. In uno studio del 2012 è stato costruito uno scaffold in hydrogel di collagene, in grado di essere fissato all'interno di un inserto standard per Transwell (Figura 21A). Il

supporto presentava, sulla superficie, delle estroflessioni tridimensionali simili, sia per dimensione che per densità, ai villi intestinali. Questo lavoro ha messo in evidenza come il gradiente di differenziamento lungo l'asse cripta-villo abbia un effetto tangibile sulla permeabilità paracellulare. Le giunzioni strette, infatti, risultano maggiormente permeabili all'apice del villo, dove la densità cellulare è, inoltre, maggiore, mentre sono più compatte a livello della cripta. Il coefficiente complessivo di permeabilità apparente risulta significativamente maggiore e più vicino a quello dell'intestino umano nello scaffold di collagene in 3D, rispetto alle comuni colture 2D (Figura 21B); mentre il TEER (come precedentemente accennato, molto alto nelle colture cellulari di Caco-2) ha subito una drastica diminuzione, portandosi a valori comparabili con quelli dell'ileo di ratto (Figura 21C).

Non è stata riscontrata una più veloce differenziamento cellulare e il sistema presenta alcuni difetti legati al materiale selezionato. In particolare, le cellule poste in coltura sullo scaffold per i canonici 21 giorni hanno generato strati sovrapposti erodendo il collagene e penetrandovi all'interno. Tale fattore potrebbe essere deleterio per lo sviluppo di un modello di assorbimento accurato perciò, gli autori hanno dovuto optare per un periodo di coltura di 14 giorni su supporto standard per poi trasferire le cellule differenziate sullo scaffold in collagene. Inoltre, è stato notato che per composti che subiscono un trasporto transepiteliale molto rapido, la membrana in collagene diventa un fattore limitante. [59]

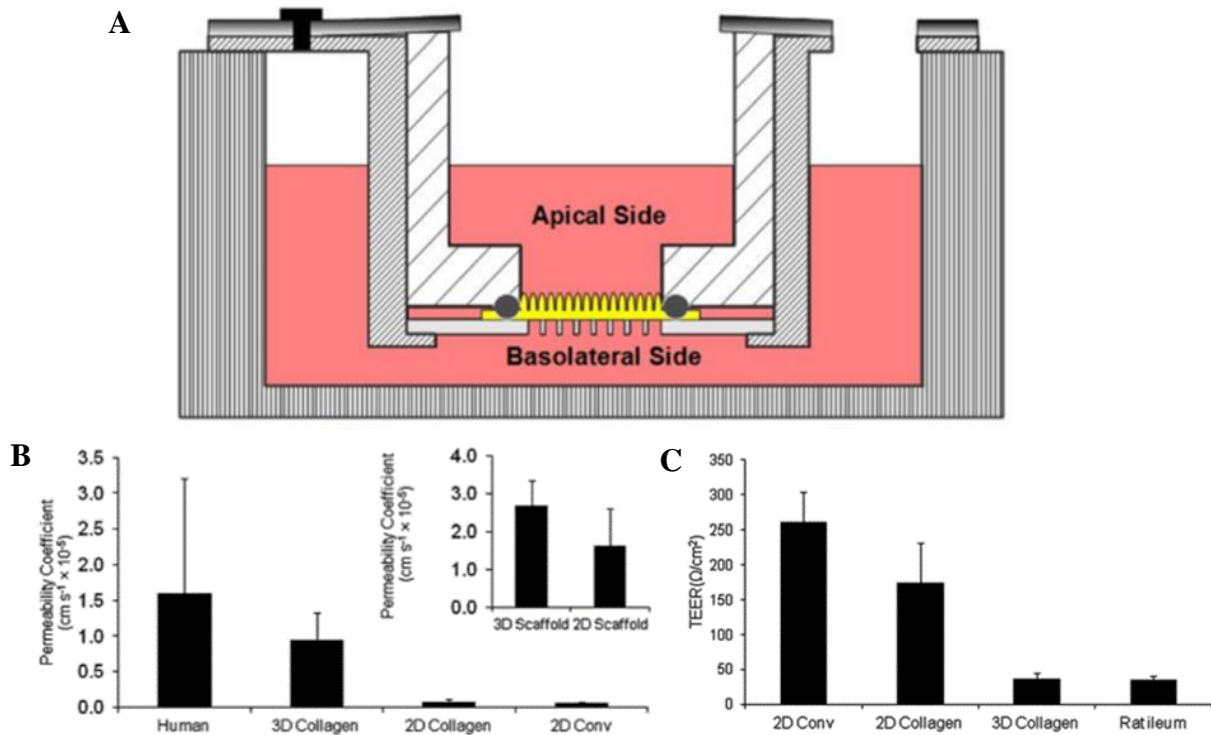


Figura 21 (A) schema illustrativo dello scaffold in collagene, che presenta i villi sulla parte apicale, montato all'interno dell'inserto del Transwell standard. (B) confronto fra le costanti di permeabilità che dimostra come lo scaffold in collagene completo di villi riesca a riprodurre più fedelmente il parametro riscontrato *in vivo*. (C) valutazione del TEER, dopo 14 giorni di coltura, nel Transwell convenzionale 2D, nello scaffold in collagene privo di villi, nello scaffold 3D che presenta le estroflessioni e nell'ileo di ratto. Nel caso dello scaffold 3D il TEER si avvicina maggiormente a quello fisiologico.

In un lavoro successivo è stato sfruttato, al posto del collagene, il PLGA (acido polilattico-co-glicolico) per la formazione di un supporto poroso sintetico tridimensionale che riproducesse i villi intestinali (Figura 22A). In questo caso è stata sfruttata una co-coltura di cellule Caco-2 con cellule HT-29MTX (che tendono ad acquisire un fenotipo secernente, simili a quello delle cellule mucipare di goblet). Anche in tale studio è stato evidenziato un gradiente di differenziamento lungo l'asse cripta-villo e un TEER minore (Figura 22B), rispetto al caso statico. Degno di nota è anche il risultato ottenuto somministrando EGF (Epidermal Growth Factor) nel compartimento basolaterale. L'introduzione di questo fattore di crescita non ha causato una differenza significativa nell'attività cellulare su Transwell (supporto su cui le cellule raggiungono il differenziamento allo stesso tempo a causa della geometria piana) mentre, tramite l'analisi della fosfatasi alcalina (Figura 22C) è stato riportato una crescita nel metabolismo dei componenti del monolayer, dopo il quattordicesimo giorno di coltura. Ciò indica che il grado di maturazione varia lungo l'asse del villo, come nel caso fisiologico. [60]

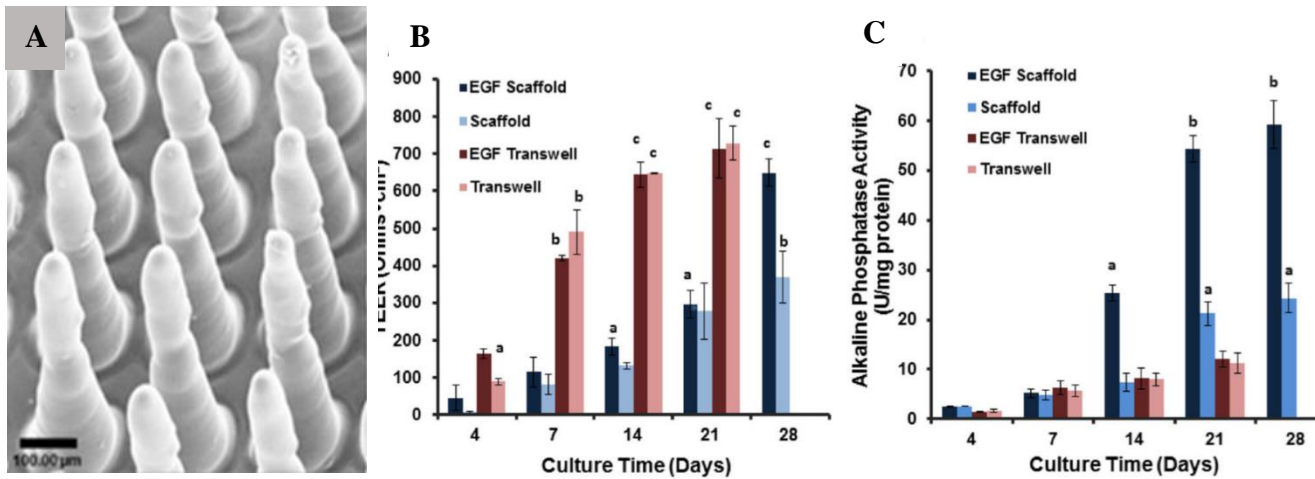


Figura 22 (A) Effetti dell'uso dello scaffold in PLGA e dell'EGF sul TEER, nel tempo. Con l'utilizzo del Transwell standard, l'EGF non ha sortito alcun effetto significativo. (B) Dal giorno 14 di coltura, grazie all'utilizzo di EGF la fosfatasi alcalina ha subito un aumento considerevole nel caso dello scaffold in PLGA, mentre non ha fatto differenza nel Transwell 2D. (C) Immagine al SEM dei villi prodotti sullo scaffold utilizzando un procedimento a più passaggi, nel quale è stato sfruttato uno stampo di PMMA e, successivamente, di agarosio per ottenere il prodotto finale.

Attraverso la costruzione di uno scaffold simile, sfruttando lo stesso materiale e la medesima morfologia, completa di estroflessioni, è stato possibile esplorare anche il legame fra microbiota e intestino, valutando l'effetto della somministrazione di ceppi batterici probiotici specifici, in questo caso: *Lactobacillus Gasseri* (LAB) ed *E.Coli Nissle 1917* (Nissle), contro l'invasione di due patogeni: *Salmonella typhimurium* (ST) e *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1). Lo studio ha evidenziato come i diversi batteri dimostrino una adesione preferenziale per cellule in diverse fasi di sviluppo. In particolare, Nissle e PAO1 si sono stanziati prettamente alla base dei villi, dove le cellule epiteliali sono meno differenziate, mentre LAB e ST sono stati ritrovati all'apice (Figura 23). Successivamente, sono stati studiati i meccanismi di interazioni fra probiotici e patogeni, dovuti a tre fenomeni: displacement, inhibition e competition che indicano, rispettivamente, la capacità del probiotico di annullare l'adesione del patogeno, quella di impedirne l'adesione prima che questa avvenga, bloccando il sito sull'enterocita e quella di competere con il patogeno per il sito, quando i ceppi sono inoculati alle stesse concentrazioni e allo stesso istante. In quasi tutti i casi, Nissle e LAB si sono dimostrati efficaci nel contrastare l'adesione dei patogeni alle cellule Caco-2, favorendo la sopravvivenza cellulare in maniera dose-dipendente. Tali risultati mettono in evidenza la possibilità di sfruttare alcuni batteri probiotici contro le invasioni di patogeni, possibile causa di diversi disturbi a carico del sistema GI; sottolineando, inoltre, che gli effetti benefici sono ottenibili anche nel caso in cui, probiotico e patogeno, occupino preferenzialmente diverse sezioni dell'asse cripta-villo. [61]

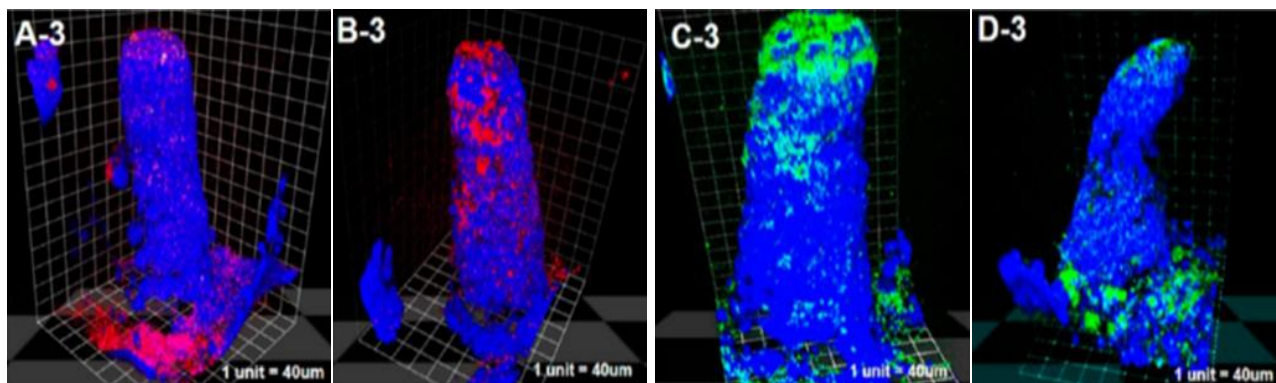


Figura 23 Posizione dei batteri probiotici (rosso) e dei patogeni (verde) sullo scaffold ricoperto di Caco-2 (blu) in cui è possibile distinguere (A-3) Nissle, (B-3) LAB, (C-3) ST, (D-3) PAO1.

Oltre l'influenza delle estroflessioni dei villi, sono stati studiati gli effetti sul comportamento delle cellule Caco-2 in coltura, di invaginazioni in grado di simulare le cripte. In uno studio sono stati costruiti degli scaffold in PDMS (poli-dimetil-silossano) rivestiti in fibronectina che presentano, sulla superficie, dei micro-well di diametri diversi (50, 100 e 500 μm), sui quali sono state seminate le cellule. In questo caso è stato dimostrato che le cellule sono in grado di adattare il loro comportamento in base alle condizioni morfologiche ambientali tramite un sistema a feedback. Questo meccanismo prevede l'imposizione di una forza sull'ambiente da parte delle cellule (tramite apposite estroflessioni) e un successivo stadio di sensing dello stimolo meccanico ottenuto in risposta dall'ambiente stesso. In base ad esso, la cellula procede con il rimodellamento e l'adattamento del proprio citoscheletro.

Dopo la semina sullo scaffold di PDMS, molte delle cellule si sono trovate intrappolate singolarmente, o a coppie, all'interno di singole rientranze, soprattutto nel caso dei pozzetti con diametro minore e ciò ha causato una ridotta rapidità di proliferazione e differenziamento. Tale risultato si trova in accordo con le caratteristiche di aumentata staminalità e permanenza allo stato non differenziato delle cellule presenti nelle cripte intestinali. Per oltrepassare gli ostacoli rappresentati dalla morfologia proposta dal substrato (Figura 24), le cellule Caco-2 hanno dimostrato una maggiore attività metabolica, dovuta all'aumentato uso di ATP per modellare il citoscheletro. Un ulteriore fattore che può influenzare la proliferazione della coltura potrebbe essere il contatto fra cellule stesse che, scambiandosi segnali chimici e fisici, può modellare lo strato epiteliale, mentre le cellule rimaste isolate dimostrano uno sviluppo più lento. Infine, le introflessioni possono dimostrarsi zone

caratterizzate da minor accessibilità da parte dei nutrienti del medium e di accumulo degli scarti metabolici, portando ad un'ulteriormente diminuzione della velocità di proliferazione cellulare. [57]

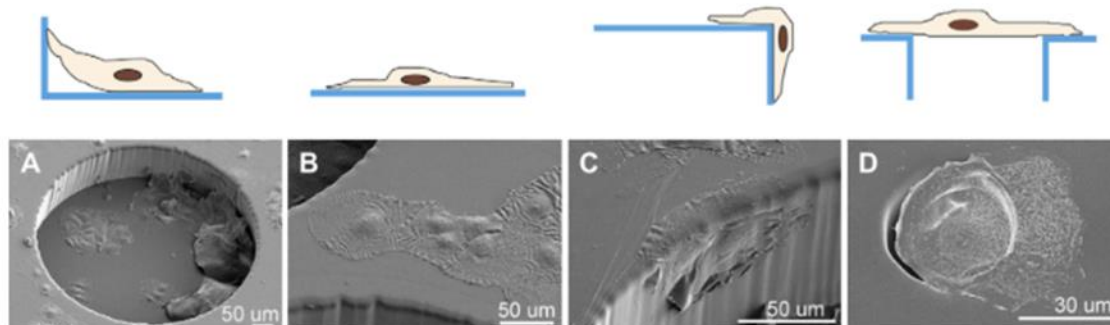


Figura 24 dimostrazione schematica (sopra) e al SEM (sotto) del comportamento delle cellule nel caso di adesione allo scaffold in PDMS ricoperto di microwell per la simulazione delle cripte, quando incontrano, rispettivamente (A) un angolo sul fondo del microwell, (B) una superficie piana tra i microwell, (C) un angolo superiore e (D) un microwell del diametro di 50 μm , che tende ad essere completamente coperto.

Ciò che i modelli precedentemente presentati non contemplano è la simulazione del flusso luminale intestinale che lambisce il lato apicale delle cellule. In un primo studio del 2014, condotto da ricercatori dell'università di Pisa, è stato costruito un bioreattore composto di due camere sovrapposte e separate dal monolayer di cellule Caco-2, poste in coltura su una membrana di materiale comunemente utilizzato nel classico modello con Transwell® (Figura 25A). Ognuno dei compartimenti, apicale e basolaterale è perfuso attraverso un circuito fluidico provvisto di pompa e reservoir per l'ossigenazione del terreno di coltura. In questo caso si è inizialmente proceduto alla scelta della velocità ottimale dei flussi dei due circuiti, utilizzando un modello computazionale denominato CFD (computational fluid dynamics), per ottenere il trasporto di soluti più efficiente. La combinazione di flussi di 200 $\mu\text{l}/\text{min}$ e 100 $\mu\text{l}/\text{min}$, rispettivamente nei compartimenti apicale e basolaterale è risultata la più vantaggiosa. Portate di entità maggiore, infatti, pur generando un gradiente pressorio più alto, avrebbero causato turbolenze e vorticosità nelle camere (Figura 25D-E-F).

È stato, quindi, effettuato il test su cellule completamente differenziate (dopo 20 giorni di coltura statica) comparando il TEER e la permeabilità del monolayer alla fluoresceina, in diverse tre condizioni: su Transwell® in condizioni statiche, sottoponendo direttamente le cellule al flusso del terreno di coltura con l'indicatore fluorescente o ricondizionando il monolayer con il flusso per 24 ore senza fluoresceina, per poi riempire il circuito con il medium contenente l'indicato e riattivando il flusso per altre 24 ore. Come risultato si è ottenuto un TEER maggiore in condizioni di coltura dinamiche, segno di una più rapida formazione delle giunzioni strette, confermato da un incremento di ZO-1. La permeabilità alla fluoresceina è risultata maggiore in condizioni statiche, in assenza di

cellule sulla membrana porosa. Tuttavia, ciò è imputabile al deposito della molecola sulla membrana del Transwell®: fattore che ha diminuito la concentrazione nel compartimento apicale, mentre tale accumulo non si ha in condizioni dinamiche. In presenza del monolayer, tale dato risulta invertito, con una permeabilità aumentata alla fluoresceina in condizioni dinamiche, restituendo un modello più preciso delle condizioni fisiologiche. [62]

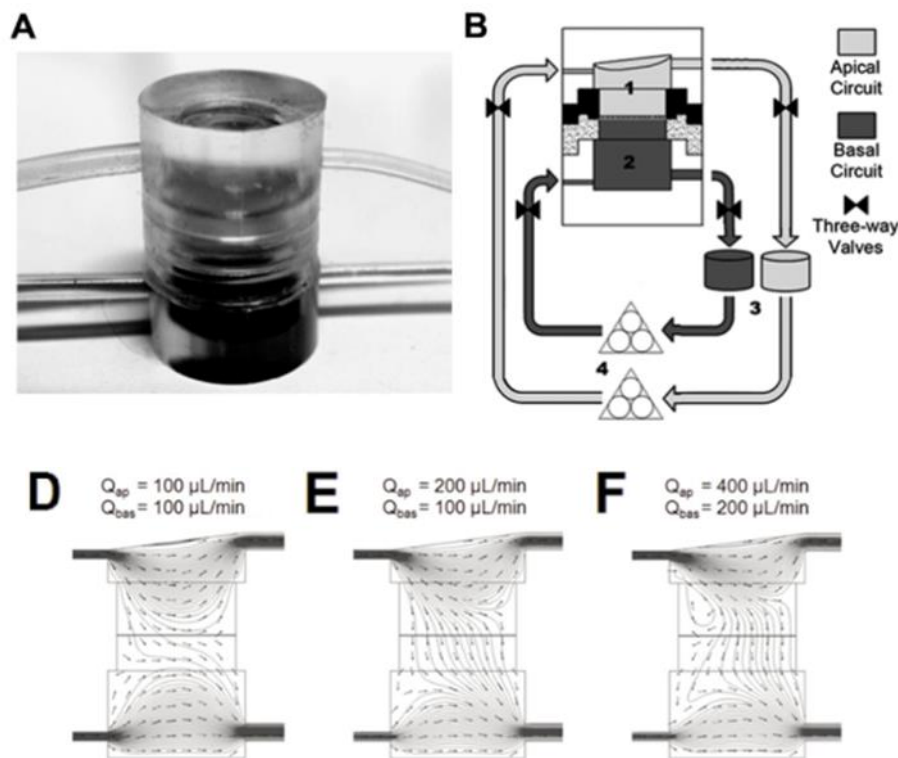


Figura 25 (A) Fotografia del bioreattore. (B) schema dei due circuiti fluidici che coinvolgono (1) il compartimento apicale, (2) quella basolaterale, (3) le camere di miscelazione e (4) le pompe peristaltiche. (D - E - F) simulazioni dei flussi ottenibili con diverse portate apicali (Q_{ap}) e basolaterali (Q_{bas}). In (F) sono chiaramente visibili delle vorticosità generate dal flusso troppo alto.

Nel 2017 è stato presentato un ulteriore un bioreattore che presentava all'interno uno scaffold poroso in PEVA (polietilene-co-vinil-acetato). In tale dispositivo sono stati uniti sia una morfologia simile a quella dei villi intestinali, che una perfusione fluidica dei due compartimenti (Figura 26). Il materiale è stato selezionato, infatti, per la sua maggiore resistenza alle forze di taglio del flusso rispetto ad altri polimeri più facilmente degradabili come il PLGA, oltre a presentare un modulo di Young molto maggiore (2 GPa, contro i 0,03 GPa del PLGA). In questo caso è stato evidenziato un pattern di differenziamento accelerato, probabilmente dovuto al turnover cellulare maggiore facilitato dal fenomeno di Anoikis. All'apice del villo, infatti, l'esposizione alla corrente è maggiore e le cellule che vi si trovano saranno più soggette a distacco per esfoliazione, dando lo spazio e lo stimolo necessari alle cellule a livello delle cripte per il differenziamento.

Inoltre, viene ipotizzato che questo continuo ciclo di apoptosi e differenziamento possa offrire una diminuita propensione alla formazione di più strati di cellule e sia la causa della maggiore sopravvivenza cellulare riscontrata. Nel caso della coltura statica di controllo, le cellule non sono sopravvissute per più di 32 giorni, mentre il bioreattore ha permesso la crescita fino a 5 settimane. La funzione intestinale è stata, poi, misurata attraverso l'uptake cellulare di glucosio, che si è dimostrata in grado di descrivere con buona accuratezza quella fisiologica *in vivo*, nel caso della coltivazione dinamica, al contrario del risultato ottenuto in statica, in cui l'uptake è risultato minore. [63]

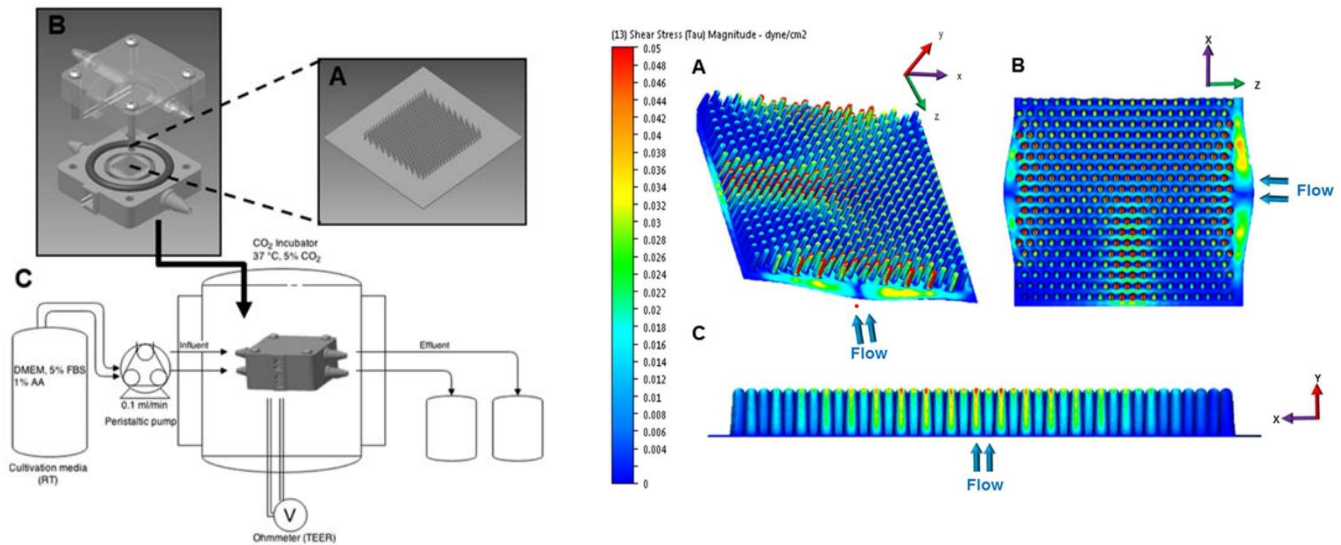


Figura 26 Schema (A) dello scaffold, (B) della camera del bioreattore e (C) dell'intero sistema che comprende l'incubatore che mantiene la coltura in condizioni ambientali controllate, il sensore per la registrazione del TEER e i serbatoi per la raccolta dei media effluenti, apicale e basolaterale. (D – E – F) vista da diverse direzioni del risultato della Computational fluid dynamics (CFD) effettuata per flussi rilevanti in campo fisiologico che hanno causato stress di taglio con valori compresi tra 0,002 e 0,1 $dyne/cm^2$. Lo stress maggiore è localizzato all'apice dei villi.

Oltre a materiali di polimerici naturali o sintetici è stata esplorata la possibilità di utilizzare, come scaffold, matrici decellularizzate per la coltivazione cellulare in un ambiente tridimensionale morfologicamente accurato. In uno studio del 2011 le cellule Caco-2 sono state poste in co-coltura con cellule hMECs (human microvascular endothelial cells) su un segmento decellularizzato di digiuno suino. Il tessuto è stato testato per 14 giorni nel bioreattore appositamente costruito (Figura 27A), composto dai due compartimenti, apicale e basolaterale come negli esempi precedenti, e i risultati sono stati comparati con una coltura statica standard. Le hMECs sono in grado di differenziarsi in cellule endoteliali dei vasi sanguigni che, *in vivo*, trasportano in circolo le sostanze assorbite dagli enterociti, fornendo un ulteriore elemento per la simulazione dell'ambiente fisiologico; tuttavia, non possono mantenere il loro stato differenziato a lungo in assenza di uno stimolo fluidico. Il modello di co-coltura

sfruttato, assieme all'utilizzo della matrice cellulare naturale e all'applicazione del flusso, ha portato a risultati rilevanti.

Le cellule Caco-2 hanno assunto una morfologia dalla forma prismatica simile a quella riscontrabile *in vivo* e l'espressione di enzimi facenti parte dell'orletto a spazzola (specialmente dipeptidasi) si è rivelata molto maggiore nel caso dinamico (Figura 27B). In quest'ultima condizione, inoltre, l'espressione di P-gp è incrementata e la P_{app} , per sostanze caratterizzate da bassa permeabilità, quali fluoresceina e desmopressina, ha subito un notevole aumento dopo il giorno 14 di coltura, avvicinandosi ai valori riscontrabili *in vivo*.

I limiti di questo lavoro risiedono nella formazione di multilayer cellulari a causa della natura neoplastica delle cellule Caco-2, che non presentano una inibizione dell'espressione delle proteine di contatto con la matrice. [64]

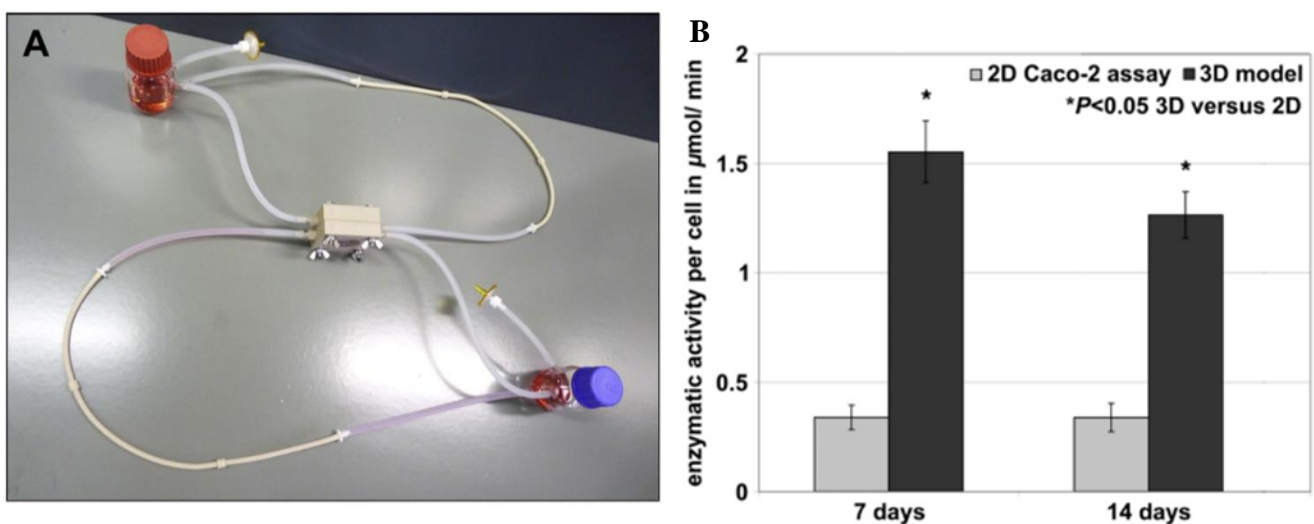


Figura 27 (A) fotografia del bioreattore con i due reservoir apicale e basolaterale connessi. **(B)** valutazione dell'attività enzimatica delle cellule dopo 7 e 14 giorni di coltura comparando (grigio) lo scaffold 2D in condizioni statiche e (nero) quello 3D composto di tessuto biologico decellularizzato sottoposto al flusso.

Negli ultimi anni, sempre più gruppi di ricerca si sono concentrati sulla possibilità di monitorare in modo continuo le condizioni delle colture in regime fluido. Nel 2016 è stato progettato un bioreattore con membrana microporosa, nella quale sono stati integrati 4 elettrodi dorati per la misurazione del TEER i quali, grazie a tale geometria sono rimasti al riparo dall'effetto del flusso (Figura 28). Tale strumento aveva l'obiettivo di valutare, prettamente, l'effetto dell'introduzione di nanoparticelle all'interno del sistema digerente poiché, alcune di esse (come quelle in argento) possono avere effetti tossici mentre, in altri casi, le nanoparticelle hanno dimostrato di poter essere sfruttate come strumenti di drug delivery, grazie alla loro capacità di penetrare nelle cellule.

Nel bioreattore presentato, la membrana che separa le due camere in PDMS, non è costituita di materiale polimerico, bensì di nitruro di silicio (Si_3N_4), poiché gli inserti standard non avrebbero permesso lo studio dell'attività delle nanoparticelle. Queste ultime, infatti, hanno dimostrato la tendenza a ostruire i pori delle membrane comunemente impiegate.

Attraverso il monitoraggio continuo del TEER (normalmente registrato solo in istanti discreti con la necessità di introdurre manualmente gli elettrodi nel Transwell) è stato possibile dimostrare che le nanoparticelle in polistirene possono essere assorbite dalle cellule intestinali senza provocare una diminuita integrità epiteliale, che sarebbe stata evidenziata da una diminuzione del TEER. [45]

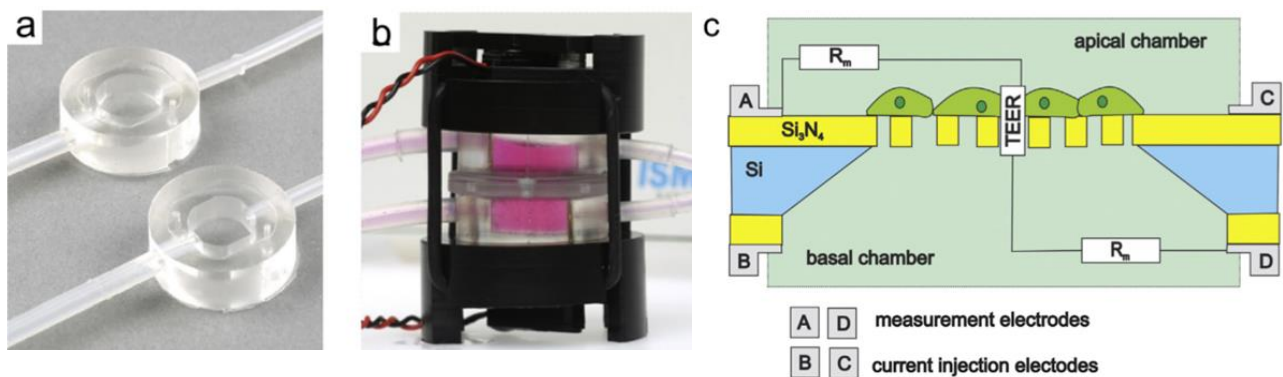


Figura 28 (a) Fotografia delle camere del bioreattore in PDMS e (b) del bioreattore completo. (c) Schema dei compartimenti apicale e basolaterale separati dalla membrana porosa in nitruro di silicio. Gli elettrodi B e C permettono di iniettare la corrente che passerà attraverso il monolayer, mentre A e D misureranno il TEER, considerando anche le resistenze R_m offerte dal terreno di coltura.

In un esperimento successivo, del 2019, è stato incorporato, in un bioreattore (Figura 29A), un sistema di monitoraggio più avanzato che ha permesso la misurazione continua del TEEI (sfruttando 4 elettrodi in argento) in uno spettro di frequenze che va da 40 a 100 Hz. Questo parametro permette di valutare lo sviluppo del monolayer con un grado di dettaglio maggiore rispetto al solo TEER, poiché solo nel caso in cui l'epitelio sia integro, la corrente è in grado di fluire attraverso la via transcellulare sfruttando le proprietà capacitive delle cellule, alle alte frequenze di stimolazione. Come ulteriore vantaggio, il dispositivo è stato dotato di coperchi in vetro (sia per la camera basale che per quella apicale), che grazie alle proprietà ottiche di trasparenza di questo materiale, hanno permesso un agevole monitoraggio ottico delle colture. La forma circolare stessa degli elettrodi, stampati sui coperchi (Figura 29B), è stata studiata appositamente per non ingombrare il campo visivo degli strumenti di ispezione ottica impiegati: microscopia confocale, imaging in campo chiaro e, ad esperimento terminato, microscopia di fluorescenza per la valutazione dell'organizzazione dei citoscheletri.

I flussi impiegati sono risultati minori di quelli luminali fisiologici, ma sufficienti a sortire un effetto rilevante sul comportamento cellulare. In particolare, la confluenza è stata raggiunta in 5 giorni dall'inizio della coltura, nel caso dinamico, mostrando un plateau del TEER raggiunto al giorno 9. Le cellule statiche (coltivate sia su piastra, che sul bioreattore privo di flusso), usate come controllo, hanno impiegato 7 giorni per arrivare a confluenza e dopo tale istante temporale il TEER ha raggiunto il plateau, segno di minore efficienza nella formazione delle giunzioni paracellulari (Figura 29F). [51]

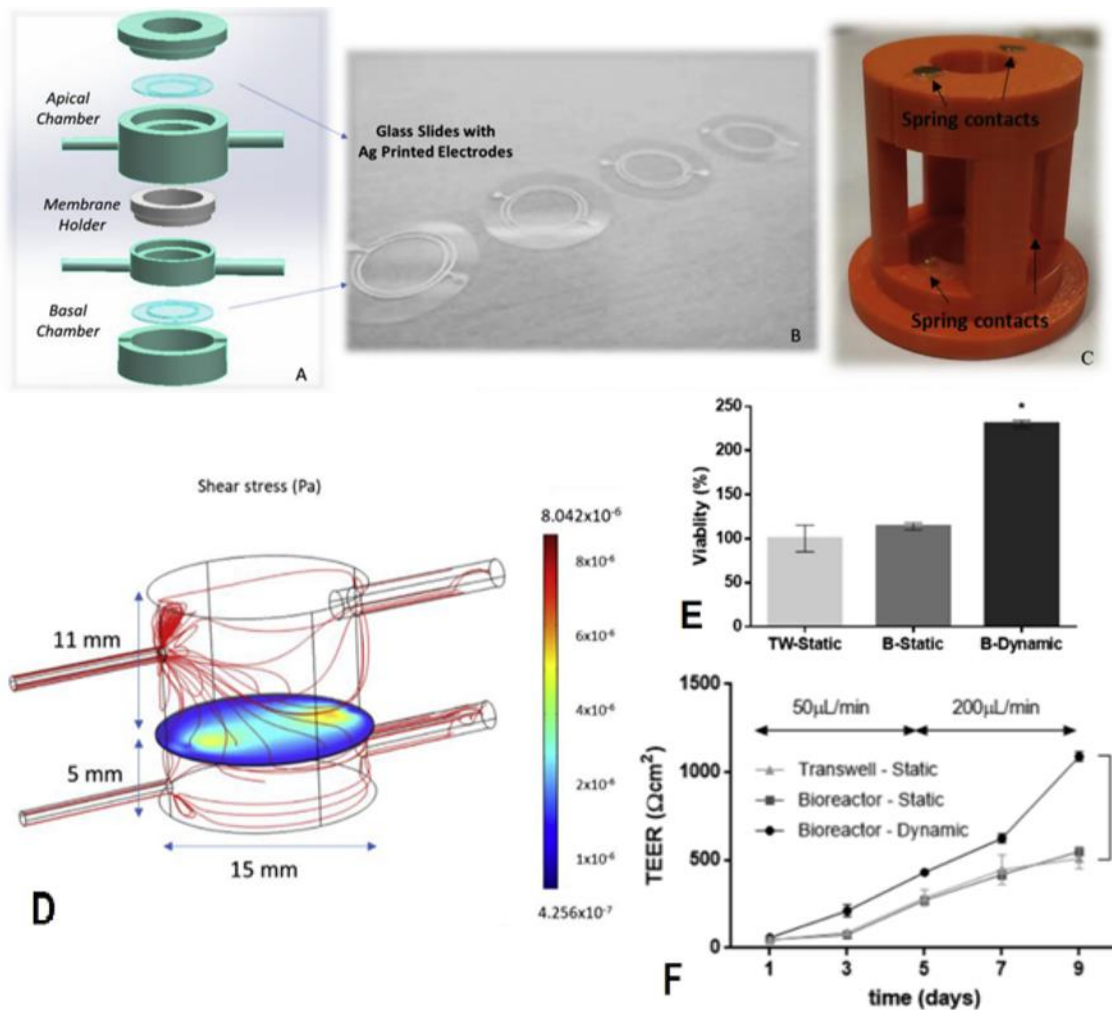


Figura 29 (A) schema del bioreattore con (B) i coperchi in vetro sui quali sono stati stampati gli elettrodi ad anello. (C) Case del bioreattore con i contatti per gli elettrodi. (D) Simulazione computazionale del flusso di media e dello stress di taglio da esso provocato sulla membrana. (E) Vitalità cellulare della coltura, che si presenta molto maggiore con l'applicazione del flusso, rispetto ai casi di utilizzo del Transwell o del bioreattore in condizioni statiche. (F) Analisi del TEER in diversi istanti temporali. Dopo il giorno 7 subisce un incremento considerevole nella coltura dinamica, mentre raggiunge il plateau in quelle statiche.

Oltre al valore di impedenza è stata esplorata la possibilità di effettuare un'analisi on-line della composizione del terreno di coltura apicale e basolaterale tramite UPLC-QTOF-MS (ultra-performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry). Per lo scopo è stata impiegata una co-coltura di cellule Caco-2 e HT29-MTX applicando il flusso (tramite pompa a siringa)

in modo simile agli esperimenti precedentemente presentati; tuttavia, gli outlet di entrambi i compartimenti sono stati collegati ad un sistema di valvole-switch il cui azionamento automatizzato permette l'analisi alternativa del contenuto apicale o basolaterale (Figura 30). La separazione cromatografica è eseguita tramite colonna di silice C18, prima della quale i fluidi vengono condotti in due colonne C8, integrate nel sistema per il pre-trattamento dei campioni e la minimizzazione della possibile contaminazione dovuta al passaggio degli effluenti lungo tubazioni condivise

Con questo metodo è stato possibile analizzare la composizione molecolare dei terreni di coltura arricchiti dei metaboliti dovuti all'attività cellulare e la permeabilità di alcune sostanze quali: Verapamil (un componente spesso sfruttato in campo farmaceutico), Ergotamina e Ergotaminina (alcaloidi spesso ritrovati nei cibi, come contaminanti, di cui si conosce poco in merito alle caratteristiche dei meccanismi di assorbimento e trasporto *in vivo*). Inoltre, è stato possibile rilevare composti sconosciuti e alcuni indicatori di attività cellulare. Gli esiti degli esperimenti sono stati comparati con quelli standard, che non offrono una valutazione on-line e automatizzata, e i risultati hanno evidenziato una corrispondenza ottimale, segno della validità del sistema. [56]

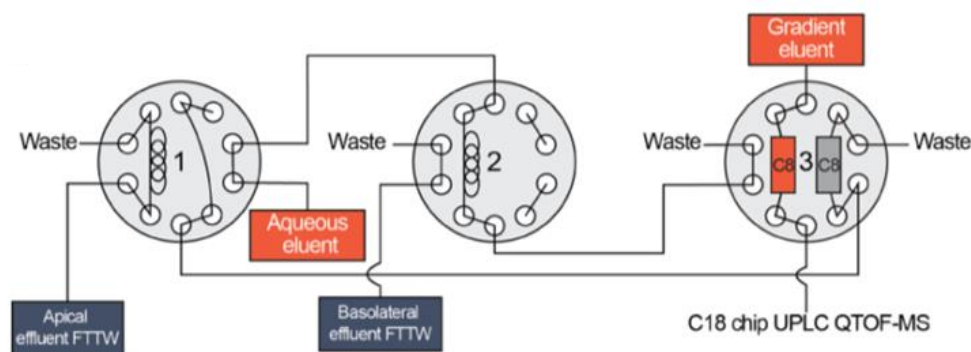


Figura 30 schema del sistema di valvole-switch per l'analisi, tramite UPLC-QTOF-MS performata con il chip C18 dei media dei compartimenti apicale e basolaterale.

Infine, un bioreattore fluidico sviluppato nel 2019, chiamato SUITE (Supervising Unit for *In vitro* Testing), mira alla modulazione dei parametri ambientali a cui sono soggette le cellule, integrando un reservoir nel quale viene miscelato il terreno di coltura (Figura 31). Questa camera è dotata di sensori di pH, temperatura e pressione idrostatica e può essere collegata a diversi bioreattori connessi in serie o parallelo, inseribili modularmente. Tramite la modulazione di parametri quali la pressione parziale di CO₂, la velocità del flusso e l'acidità del medium sarebbe possibile regolare la crescita delle colture, le loro interazioni e ottenere un range molto vasto di dati, in base al meccanismo molecolare in esame. Il bioreattore è stato studiato su cellule epatiche (HUVEC - Human Umbilical Vein Endothelial cells e C3A), ma la sua applicazione potrebbe portare beneficio a colture cellulari diverse, fra cui le Caco-2. [65]

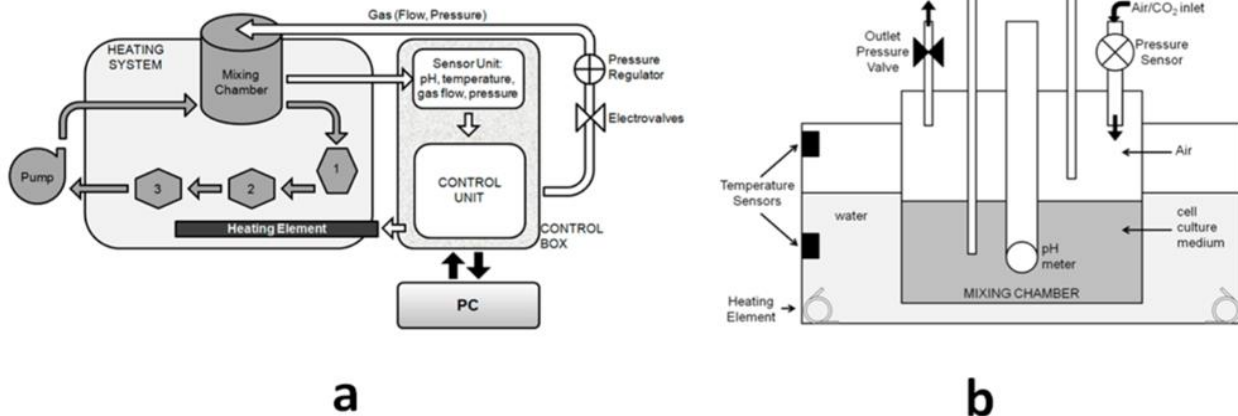


Figura 31 (a) schema del SUITE completo di sistema di riscaldamento, slot modulari (1, 2 e 3) per alloggiare i bioreattori, unità di controllo e sensoristica. (b) Schema completo di sensori e attuatori della camera di mescolamento del medium.

Una delle tipologie di supporti maggiormente sfruttati nella riproduzione dell'apparato digerente è quello degli Organs-on-chip (OOC): bioreattori a perfusione microfluidica miniaturizzati, ad alto throughput e adatti alla coltivazione di diversi tipi di cellule. Uno degli studi più completi che sfrutta le potenzialità di questa tecnologia è, tutt'ora, quello presentato da Kim et al. nel 2012. Il dispositivo ideato da questo gruppo di ricerca, si compone di due camere fluidiche, fabbricate in PDMS, sovrapposte (ognuna di 150µm di altezza e 100 µm di larghezza) e separate da una membrana porosa (dello spessore di 30 µm e con porosità del diametro di 10 µm), dello stesso materiale. Su di essa, sono state seminate cellule Caco-2 dopo un processo di rivestimento con una soluzione di collagene di tipo I e Matrigel per facilitare l'adesione. Due camere a vuoto, posizionate ai lati delle camere fluidiche hanno permesso la deformazione del dispositivo, simulano i movimenti peristaltici intestinali (Figura 32). [27]

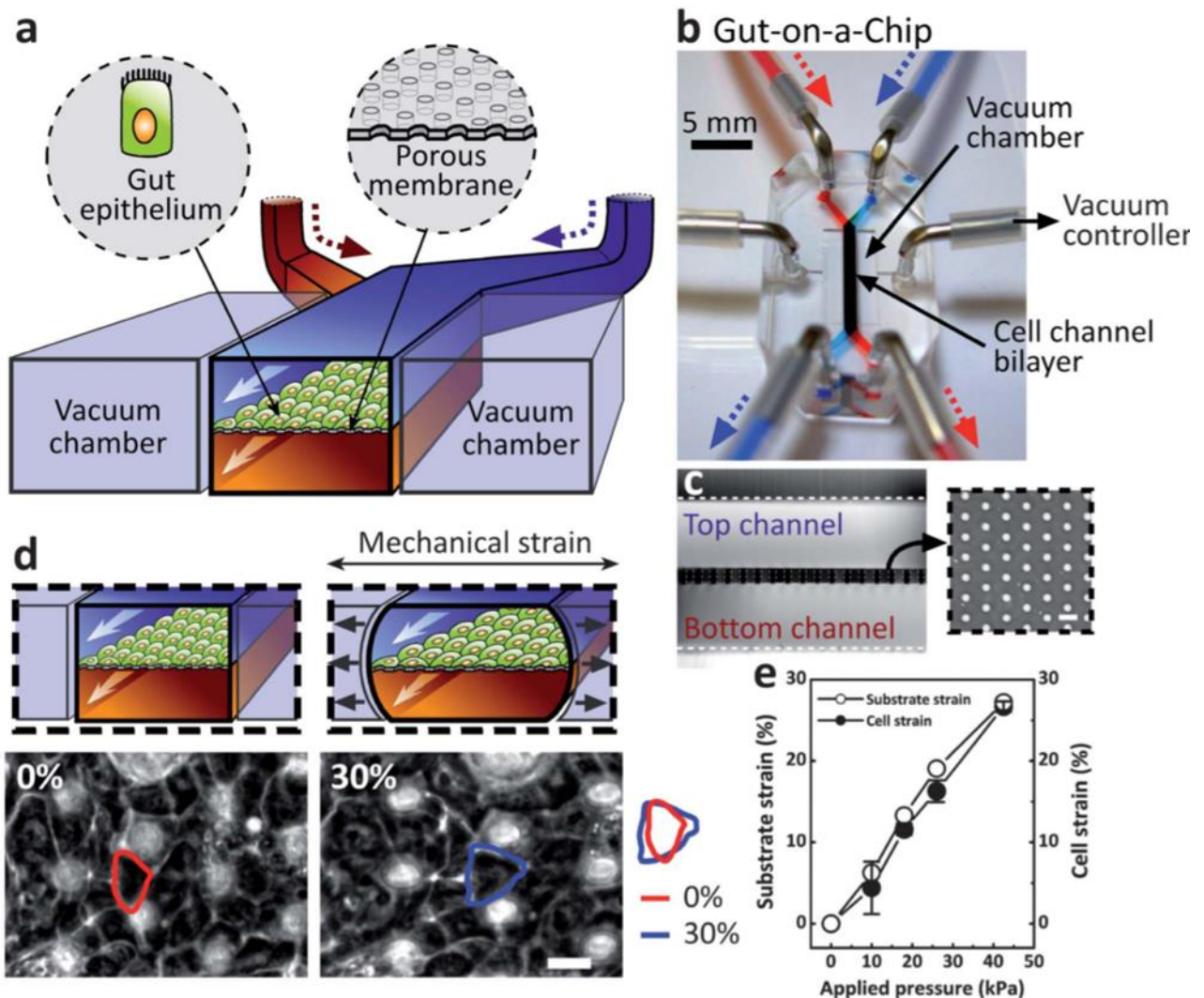


Figura 32 (a) Schema dell'OOC completo di canali fluidici separati dalla membrana su cui sono seminate le cellule Caco-2 e affiancati dalle camere a vuoto. (b) Fotografia dell'OOC. (c) Vista in sezione anteriore delle camere fluidiche e dall'alto della membrana porosa interposta. (d) Comparazione fra le dimensioni della stessa cellula prima (contorno rosso) e dopo (contorno blu) la deformazione imposta dal sistema di pompe a vuoto. (e) Curve di stress-strain per il materiale cellulare e il substrato polimerico.

È stato, quindi, applicato un flusso, tramite pompa a siringa, di 30 $\mu\text{L/h}$ in entrambi i compartimenti, confrontando i risultati con un controllo statico su Transwell[®]. Si è notato che, dopo soli tre giorni in presenza di flusso, le cellule Caco-2 mostravano la formazione spontanea di villi più alti e definiti (Figura 33d), oltre ad una maggiore polarizzazione e alla presenza di cellule mucipare, rispetto alla coltura di controllo portata avanti per i canonici 21 giorni. Diminuendo il flusso a 10 $\mu\text{L/h}$ tale effetto non si è manifestato, mentre aumentandolo a 100 $\mu\text{L/h}$ non è stato riscontrato alcun miglioramento rispetto ai 30 $\mu\text{L/h}$. L'applicazione della deformazione ciclica del 10% non ha impattato sul fenotipo cellulare o sul TEER, rispetto all'applicazione del solo flusso, ma ha causato un aumento considerevole della P_{app} al FD20 (fluorescent dextran), che si era dimostrata comparabile nelle condizioni statiche e dinamiche senza deformazione (Figura 33b). È stato ipotizzato che il movimento

peristaltico causato dalle camere a vuoto sia stato sufficiente, a differenza del solo flusso, a rimescolare lo strato fluido che può formarsi sulla regione apicale del monolayer e che limita la diffusione di alcune molecole. Tali risultati sono stati confermati anche da studi successivi in cui, in presenza di un flusso laminare, si è ottenuta una rapida differenziazione delle cellule Caco-2 e la formazione di protrusioni simili a villi intestinali in soli 5 giorni di coltura, con un aumento della P_{app} relativa a profarmaci lipofili chemoterapici. [27] [66]

Infine, è stata posta in coltura nella camera fluidica superiore la colonia batterica di *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG): un comune organismo commensale intestinale. Dopo 96 ore, il batterio ha dimostrato di mantenere l'aderenza al monolayer e una vitalità del 95% provocando, inoltre, un miglioramento dell'integrità della barriera, riscontrabile da un aumento del TEER. Tale effetto non è stato dimostrato nel caso statico, dove l'acidificazione del medium stagnante causata dal batterio, ha compromesso la funzionalità e la morfologia epiteliale. [27]

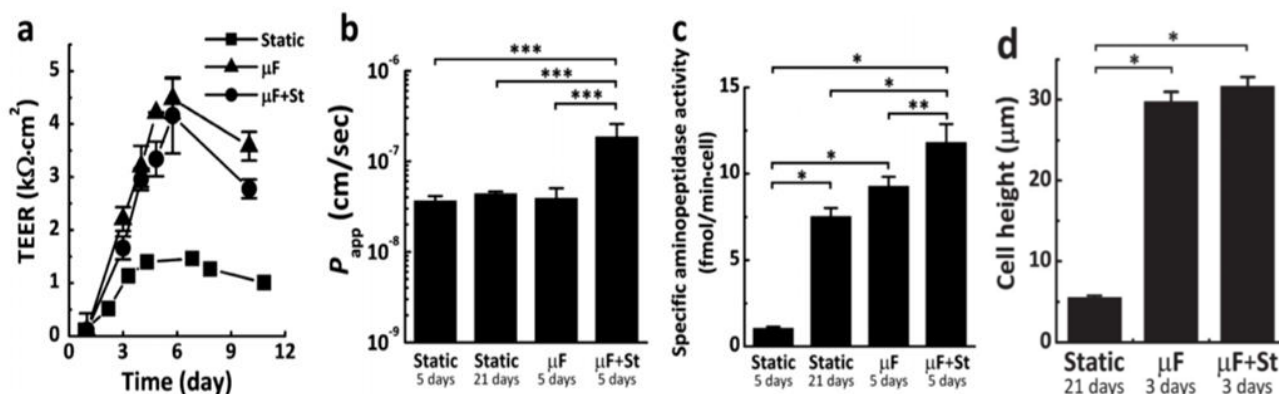


Figura 33 (a) Curve del TEER nel tempo comparando le diverse configurazioni statica(static), dinamica (μF), e dinamica con deformazione (μF+St). (b) Differenze nella P_{app} , (c) nell'attività enzimatica e (d) nell'altezza dei villi, nelle diverse configurazioni.

Questo risultato sottolinea l'importanza dell'interazione ospite-microbiota e diversi studi si sono avvalsi della tecnologia degli OOC per la generazione di un gradiente di ossigenazione che permettesse la convivenza delle cellule epiteliali (che necessitano di ossigeno per la sopravvivenza) e dei batteri anaerobi stretti particolarmente presenti nel colon. Per ottenere questo risultato è stato selezionato il PDMS come materiale di costruzione delle camere fluidiche e della membrana, in virtù delle sue caratteristiche di alta permeabilità ai gas, trasparenza e deformabilità.

In tale studio, sono stati preventivamente iniettati all'interno dei canali microfluidici, due flussi di medium distinti: uno arricchito di ossigeno, nel compartimento basolaterale, e uno anossico, in quello apicale (Figura 34). Si è proceduto testando tale configurazione in assenza dell'epitelio di Caco-2 adeso alla membrana (interponendo, quindi, solo quest'ultima fra le camere) e in sua presenza, variando le velocità dei flussi. È stata trovata, sia attraverso la simulazione computazionale, che

attraverso il test di laboratorio, la combinazione ottimale per la formazione di un gradiente di ossigenazione simile a quello riscontrabile *in vivo* (causato dalla diffusione dell'ossigeno dai capillari sanguigni verso il lume) e sono stati, successivamente, posti in coltura due diversi batteri anaerobi stretti, separatamente. In particolare, sono stati selezionati *Bifidobacterium adolescentis* (DSM 20083) e *Eubacterium hallii* (DSM 17630) per la loro funzione omeostatica nel colon, dovuta alla produzione di SCFA.

Entrambi hanno dimostrato di poter co-abitare con le cellule epiteliali all'interno del bioreattore in cui era stato impostato il gradiente, per una settimana, senza provocare un danno all'integrità del monolayer. Ciò non è stato riscontrato fornendo terreno di coltura ossigenato in entrambi i compartimenti, condizione che ha portato alla morte delle colonie batteriche. [67]

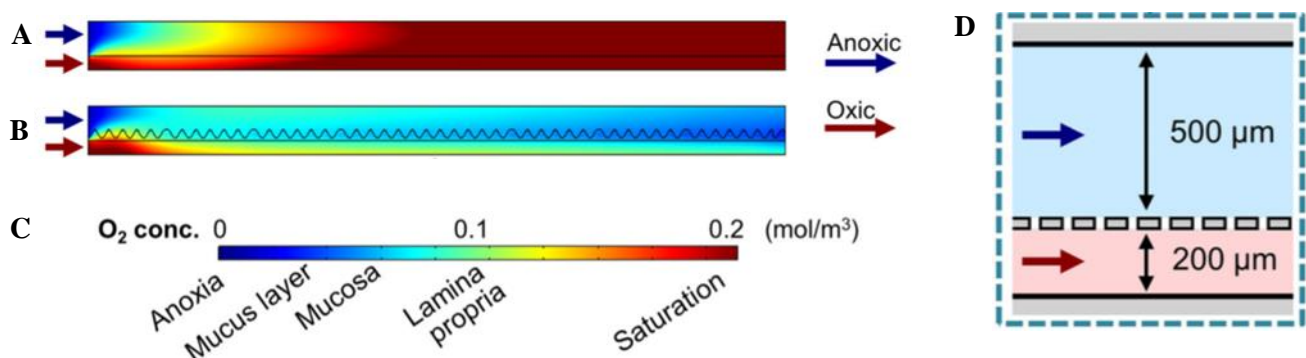


Figura 34 Profili di ossigenazione all'interno dei condotti (A) in presenza o (B) in assenza del monolayer cellulare. (C) Scala colorimetrica del livello di ossigenazione con indicazione dei tessuti a livello dei quali può essere fisiologicamente riscontrata tale saturazione di ossigeno. (D) Vista in sezione dei condotti fluidici dell'OOC.

Una delle caratteristiche primarie che accomuna la quasi totalità dei sistemi biologici è l'interconnessione fra i diversi organi e tessuti. Tale caratteristica è alla base della complessità richiesta ai modelli artificiali per riprodurre l'ambiente organico *in vitro* o in silico. Un singolo OOC non è sufficiente a raggiungere questo livello di dettaglio ma, sfruttando i canali fluidici come mezzo di connessione (assimilabile al torrente circolatorio sistemico), diversi gruppi di ricerca hanno sviluppato sistemi composti da più OOC in grado di scambiare fra loro informazioni di carattere chimico e molecolare. I dispositivi che soddisfano tali requisiti sono stati denominati in diversi modi, fra i quali: Human-on-chip (HuBoC), Body-on-chip, Multi-organs-on-chip (se le colture sono incorporate in un'unica piattaforma microfluidica) o organismoidi (se i modelli cellulari sfruttati per riprodurre i diversi organi sono ottenuti tramite la tecnologia degli organoidi).

Le applicazioni di questi dispositivi possono essere molteplici, in virtù della loro elevata capacità di riprodurre il comportamento fisiologico (o quello attivato dalla somministrazione di uno stimolo specifico), dell'organismo umano.

Le piattaforme HuBoC possono essere sfruttate per la coltivazione di cellule tumorali prelevate direttamente dai tessuti patologici dei pazienti e verificare l'effetto di farmaci terapeutici in condizioni di sicurezza per l'individuo donatore stesso, che riceverà la terapia solo in caso di esito positivo del test *in vitro*. Le neoplasie, in alternativa, possono essere indotte, successivamente, dopo la semina, per studiare il processo di sviluppo e crescita tumorale, oltre ai meccanismi molecolari che vi sottendono.

Gli HuBoC rappresentano una tecnologia che si trova ancora nella sua infanzia, non ancora interamente validata nel caso di studi tossicologici standardizzati, ma che presenta una promettente risorsa per il futuro. Con l'avanzare della ricerca in questo campo, sono nati diversi sistemi, alcuni dei quali in grado di incorporare fino a 10 sistemi interconnessi: circolatorio, endocrino, gastrointestinale, immunitario, tegumentale, muscoloscheletrico, nervoso, riproduttivo, respiratorio e immunitario; riducendo la dimensione del corpo umano di un fattore 100000 riproducendo, comunque, le sue essenziali funzioni. [68]

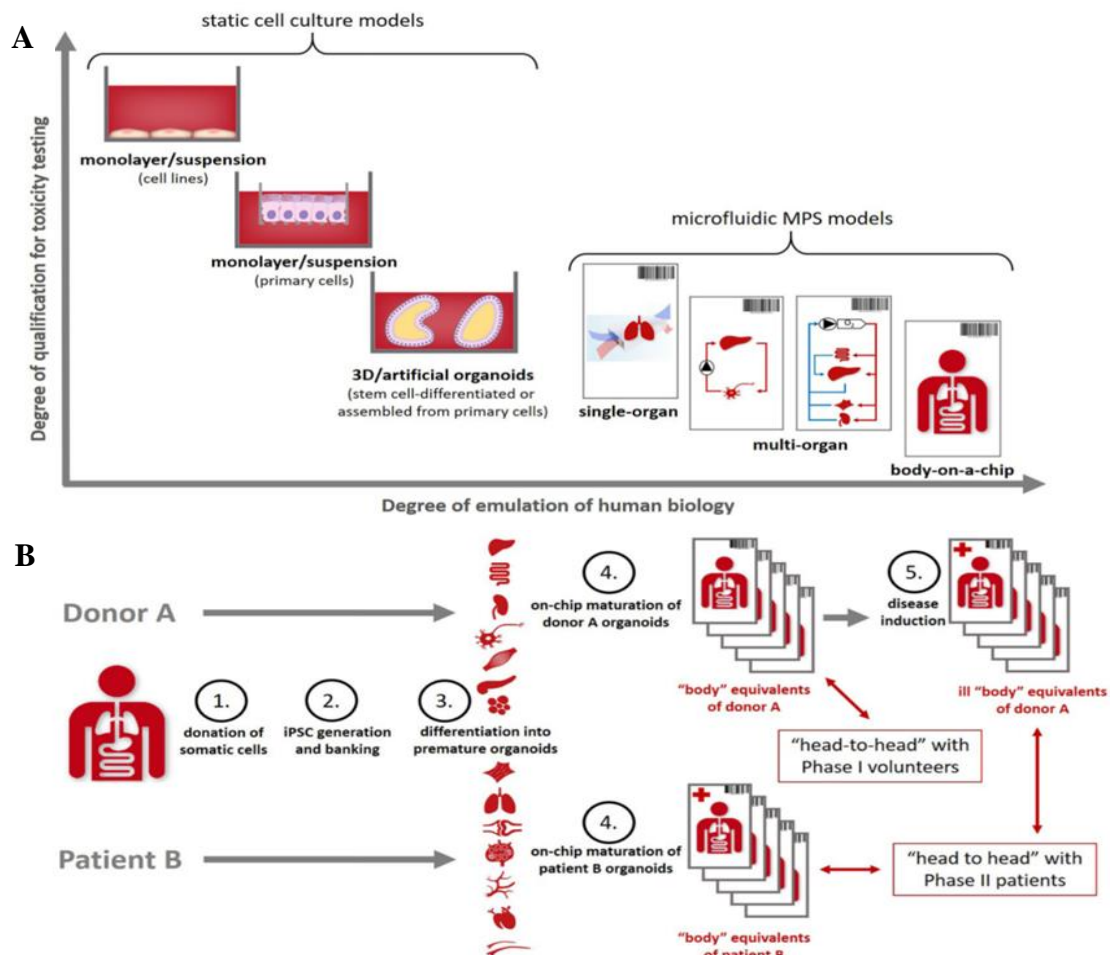


Figura 35 (A) Comparazione fra colture statiche e MPS riguardo all'utilizzo in campo tossicologico (asse delle ordinate) e al grado di emulazione della fisiologia umana (asse delle ascisse). (B) Procedure per la generazione di modelli cellulari su chip partendo dai tessuti di un donatore sano nei quali è, successivamente indotta la patologia *in vitro* o tramite il prelievo di tessuti da un soggetto già affetto dallo stato patologico.

Una delle piattaforme che sfrutta gli OOC nella loro configurazione più classica: collegandoli fra loro in serie, tramite il sentiero microfluidico, è stata denominata MINERVA (MICrobiota-Gut-BraiN EngineeRed platform to eVALuate intestinal microflora impact on brain functionality). Questo dispositivo è formato da 5 compartimenti, ognuno dei quali alloggiato in un OOC in PDMS che comprende tre scaffold porosi indipendenti, sui quali sono seminate le specifiche colture cellulari (Figura 36). Ognuno degli OOC, denominati MOAB (miniaturized optically accessible bioreactor), è suddiviso in due camere: una superiore, dalla quale viene introdotto il flusso di terreno di coltura dal precedente bioreattore e una inferiore nella quale si riversa il terreno di coltura arricchito dai prodotti del metabolismo cellulare della coltura (secretoma), passando attraverso la membrana. I sistemi riprodotti sono, rispettivamente dal primo (che comprende l'inlet del sistema), all'ultimo (che fornisce l'outlet), il microbiota, l'intestino (che sfrutta le cellule Caco-2), il sistema immunitario (completo di macrofagi e linfociti), la barriera ematoencefalica e il cervello (che comprende neuroni, microglia e astrociti).

Con tale configurazione, il progetto MINERVA, si propone di studiare le interazioni biochimiche e ormonali che intercorrono fra l'intestino e il cervello considerando, inoltre, il contributo dei batteri commensali e delle cellule immunitarie.

Con lo studio dell'asse microbiota-intestino-cervello (impossibile da modellare attraverso le canoniche colture cellulari) si aprono nuove possibilità di comprensione di particolari malattie neurodegenerative come il morbo di Parkinson e di Alzheimer, il cui legame con la flora microbica intestinale, l'alimentazione e lo stile di vita, è tutt'ora solamente ipotizzabile. [69] [70]

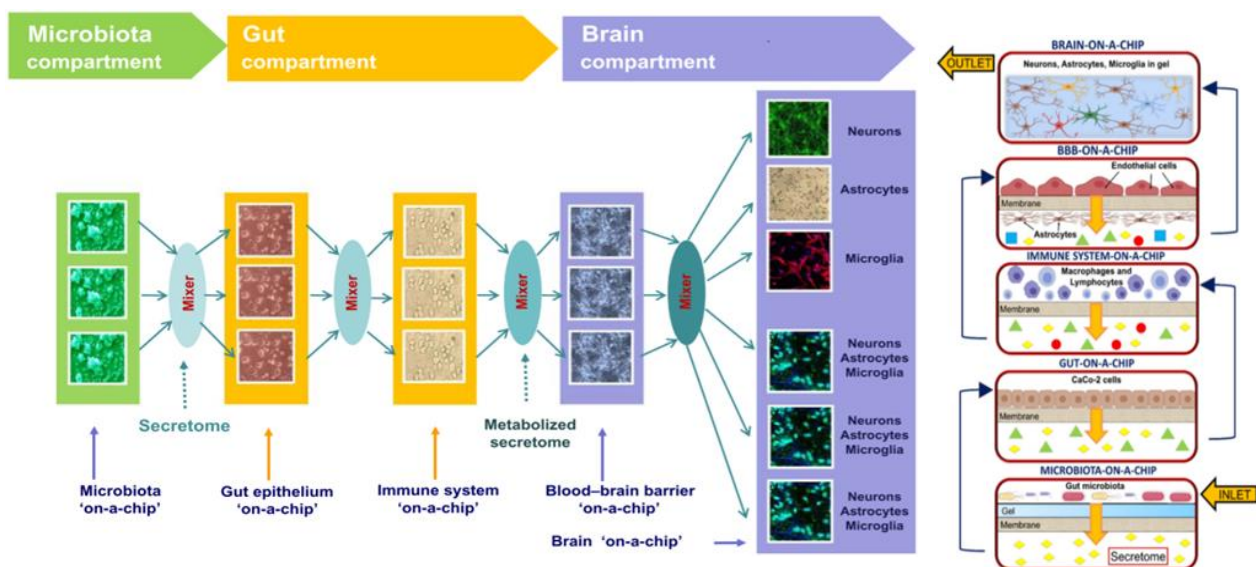


Figura 36 Schemi dei 5 compartimenti e delle cellule che li colonizzano, proposti dal progetto MINERVA, collegati fra loro tramite un percorso fluidico nel quale si interpongono, dopo ogni bioreattore, camere di miscelazione del secretoma.

Un dispositivo particolare, che si discosta dalla definizione di OOC per abbracciare quella di MPS, ha previsto una configurazione aperta, che rende l'accessibilità e la manipolazione delle colture e del sistema fluidico, più agevole, prendendo il nome di "physiome-on-a-chip". Questa piattaforma incorpora una serie di 26 pompe programmabili, in grado di fornire un flusso che spazia da 0,05 a 300 $\mu\text{L}/\text{min}$ all'interno del circuito fluidico, strutturato con un design simile a quello di una piastra multi-well standard, in cui i pozzetti sono posti in comunicazione fra loro. Su tale supporto è possibile alloggiare diversi MPS e viene, inoltre, fornita la possibilità di rimuovere, sostituire o scambiare i moduli anche durante l'attività della piattaforma, oltre a garantire l'accesso sia al lato apicale che a quello basolaterale.

Il physiome-on-a-chip è costruito in Polisulfone (PSF), materiale che, al contrario del PDMS, non ha la tendenza ad assorbire molecole di natura idrofilica sulla sua superficie. Il PDMS è selezionato come materiale di costruzione di molti OOC grazie alla sua permeabilità all'ossigeno, tuttavia, in una configurazione aperta come quella presentata da questo studio, lo scambio di ossigeno può avvenire direttamente all'interfaccia aria-liquido sulla superficie del terreno di coltura all'interno dei pozzetti.

Il dispositivo è stato testato in tre diverse configurazioni, la prima delle quali comprendeva 4 MPS: fegato, polmoni, intestino e endometrio. Sono, successivamente, stati aggiunti cervello, cuore e pancreas, nella versione a 7 MPS e, infine, reni, pelle e muscoli scheletrici nella configurazione finale a 10 MPS. Tutte le combinazioni hanno dimostrato la capacità di mantenimento della funzionalità cellulare in condizioni di flusso continuo, rispettivamente, per 2, 3 e 4 settimane. [71]

Un diverso approccio alla riproduzione del corpo umano *in vitro* è quella dei MOC (Multi-organs-on-chip). Tali piattaforme a circuito chiuso offrono il vantaggio di avere a disposizione l'intero sistema in un singolo chip, senza la necessità di tubazioni esterne di collegamento, con un ulteriore risparmio di terreno di coltura e reagenti. Un esempio è lo studio in cui è stato testato un chip in cui sono stati incorporati 4 organi: intestino, fegato, pelle e reni, con l'obiettivo di simulare l'assorbimento intestinale di molecole terapeutiche, l'azione detossificante del fegato e la conseguente escrezione dei residui metabolici (Figura 37).

Il dispositivo si compone di due circuiti fluidici, uno dei quali collega i 4 organi fornendo un ricircolo pulsatile di medium attraverso una micropompa peristaltica, mentre il secondo provvede alla simulazione dell'escrezione renale. La sperimentazione ha avuto la durata di 28 giorni, trascorsi i quali è stata verificata la vitalità delle colture, evidenziando il mantenimento della corretta morfologia e un'ottima funzionalità di tutti i compartimenti. [72] [73]

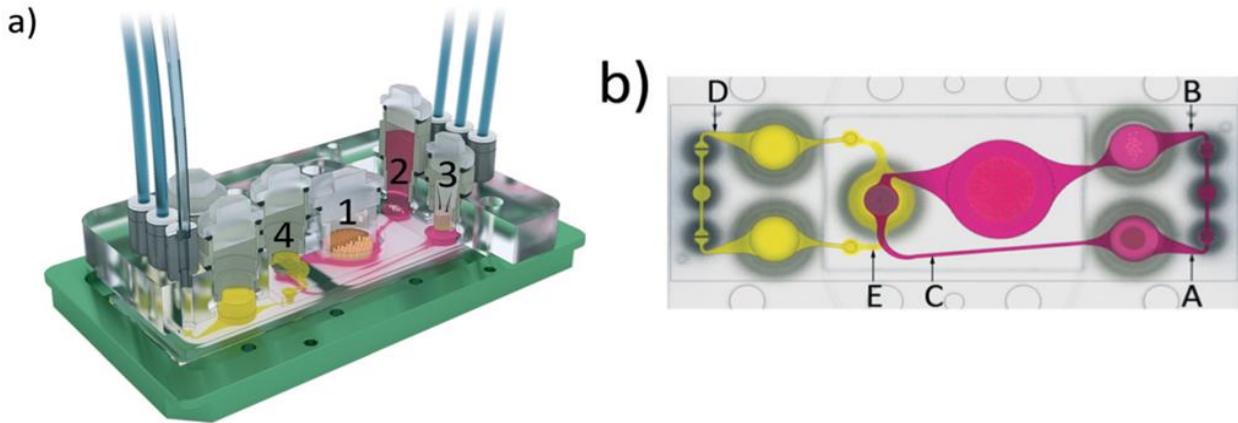


Figura 37 (a) Schema del MOC che comprende i 4 organi collegati dai due percorsi fluidici. (b) Vista schematica dall'alto del MOC con la rappresentazione in giallo del percorso di smaltimento renale e in rosa quello della circolazione sistemica che collega i vari organi, dove A,B,C,D ed E sono i punti in cui effettuare le misurazioni sul media.

Un metodo particolarmente elaborato per effettuare una connessione fluidica fra MPS è quello utilizzato in un recente lavoro nel quale è stato presentato un sistema automatizzato, chiamato "Interrogator" (Figura 38A). Si tratta di un braccio robotico in grado di muoversi su tre assi per prelevare campioni di terreno di coltura dai diversi OOC incorporati nella piattaforma e dispensarli al chip ricevente di interesse. Ad esso è stato associato un sistema di microscopia per l'imaging in-situ delle colture.

Il sistema si compone di 8 OOC (pur avendo la possibilità di alloggiarne fino a 10), ognuno dei quali comprendere un inlet e un outlet per la continua perfusione del materiale cellulare (Figura 38B). Questa configurazione è volta a far fronte ad alcune delle sfide ancora presenti nel campo degli HuBoC.

In primo luogo, l'utilizzo di un dispensatore robotico permette di omettere la complessità di un sistema microfluidico di pompe e tubazioni (con le quali aumenta il rischio di formazione di bolle) semplificando il sistema, pur ottenendo una precisione che i mezzi passivi di distribuzione del terreno di coltura non possono raggiungere. La modularità del sistema è ottenuta senza la necessità di sistemi di valvole e micro-switch per deviare i flussi e, inoltre, l'automatizzazione permette una maggiore riproducibilità e standardizzazione dei risultati rispetto alle manipolazioni operatore-dipendenti.

Questo sistema HuBoC, in definitiva, si rivela uno strumento versatile, ad alti throughput e precisione per l'interconnessione di diversi OOC, che offre un design compatto e opera senza la restrizione imposta da sentieri microfluidici preimpostati. [74] [75]

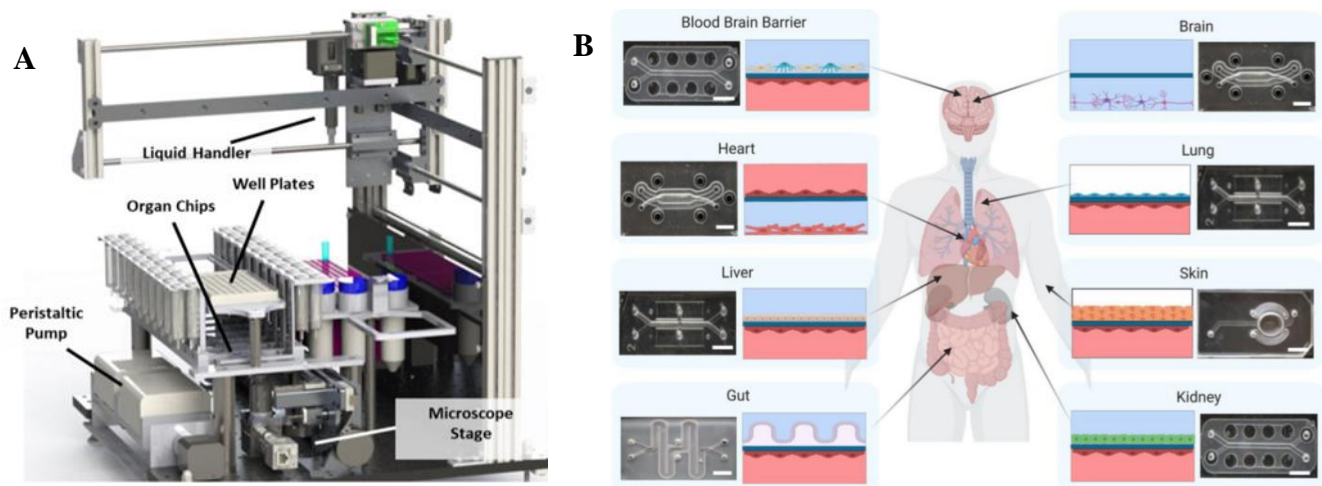


Figura 38 (A) schema del sistema automatizzato di dispensazione del media fra i vari OOC controllato tramite l'azione programmabile dell'interrogator. **(B)** Rappresentazione degli 8 OOC utilizzati per modellare i rispettivi organi biologici.

Questi esperimenti, nel complesso, evidenziano come sia necessaria, nello sviluppo di modelli per lo studio dell'assorbimento intestinale che sfruttano la linea cellulare Caco-2, una fedele riproduzione delle caratteristiche ambientali, morfologiche, meccaniche e strutturali dell'ambiente biologico. Inoltre, la facilità di estrazione dei risultati dai dispositivi di coltura attraverso sensori appositi viene particolarmente apprezzata nel campo della ricerca farmaceutica e alimentare, nei quali è necessario elaborare una grande mole di dati.

2.5.6 Limitazioni delle cellule Caco-2

Malgrado l'ampio utilizzo delle cellule Caco-2 nel corso degli anni, questo modello cellulare presenta ancora diverse limitazioni.

Una di queste, già menzionate in precedenza, è il livello di TEER, che risulta molto maggiore rispetto quello dell'epitelio *in vivo*, una volta raggiunto il completo differenziamento. La cacoficità e la staticità dei parametri ambientali rappresentano un ulteriore ostacolo alla riproducibilità *in vitro* su Transwell®; ostacolo al quale hanno tentato di far fronte i diversi design fluidici e tridimensionali dei bioreattori sviluppati.

Un limite ancora difficile da superare è quello dovuto alla variabilità nelle colture sviluppate nei diversi laboratori, che si rispecchia nelle discrepanze fra i risultati ottenuti in set-up distinti. La variabilità può essere data da differenze in: condizioni di coltura (composizione, pH, osmolarità del terreno di coltura), condizioni sperimentali (trattamento delle cellule, lavaggi con buffer salino) e numero di passaggi ed età delle cellule. Anche a parità di protocollo di coltura, queste sorgenti di errore possono portare alla diversa espressione di alcuni trasportatori, come il P-gp.

Proprio il pattern di espressione di enzimi e trasportatori può rivelarsi il maggior fattore limitante nell'utilizzo di cellule Caco-2. Alcuni trasportatori, particolarmente rilevanti nella ricerca farmaceutica, sono sottoespressi rispetto all'ambiente *in vivo*, come nel caso di quelli che, come substrato, presentano i farmaci ACE-inibitori, la cui permeabilità *in vitro* risulta molto ridotta. Anche molecole terapeutiche idrofiliche con basso peso molecolare come la metformina sono scarsamente assorbite *in vitro* mentre, sull'uomo, l'assorbimento si attesta attorno al 50%. Tali mancanze sono dimostrate anche dalla differente espressione genica delle cellule Caco-2.

L'espressione ridotta riguarda anche l'enzima digestivo CYP-3A4, che può essere, però, incentivata attraverso una diversa composizione del terreno di coltura o con la trasfezione delle cellule. Tale tecnica è stata impiegata anche per indurre l'espressione del trasportatore PEPT1 che non può essere, altrimenti, sintetizzato dalle cellule Caco-2 in condizioni di coltura standard. L'utilizzo di questa strategia di biologia molecolare ha, tuttavia, presentato diversi svantaggi e risultati non sempre consistenti. [47]

La soluzione nella quale avviene sviluppata la coltura è di natura acquosa, perciò, nel caso di molecole scarsamente idrosolubili in fase di studio è necessario aggiungere solventi che possono, tuttavia, essere dannosi per le cellule Caco-2, se addizionati in alte concentrazioni. [50]

La natura neoplastica, inoltre, si rivela un fattore limitante, poiché sono stati riscontrati comportamenti differenti dalle cellule native intestinali nel caso di interazione con microbi e patogeni. Spesso, le cellule Caco-2, poiché dimostrano una scarsa capacità di differenziarsi in cellule mucipare, devono essere poste in co-coltura con HT29-MTX che, invece, riproducono tale fenotipo e secernono lo strato di muco necessario per la riproduzione fisiologica intestinale. [47] [50]

Il throughput degli assay di permeabilità intestinale su 12 o 24-well standard è molto basso e ciò provoca l'aumento del prezzo per la sperimentazione di nuovi farmaci, che si attesta attorno ai 19\$ per ogni test effettuato. A tale scopo sono stati implementati multi-well più ampi (che comprendono fino a 96 pozzetti) per aumentare l'efficienza dei processi di studio. [76]

Il cambio del terreno di coltura nell'arco dei 21 giorni standard per raggiungere confluenza e differenziamento deve essere effettuato ogni 2-3 giorni (minimo 9 cambi in tale arco temporale) e ciò

causa uno stress importante sulle cellule. In caso di rimpiazzo completo del terreno di coltura esausto con quello fresco (ricco di nutrienti, fattori di crescita e antibiotici) è stata osservata in diverse linee cellulari l'attivazione di geni legati alla sofferenza cellulare come il p8, che riveste la stessa funzione di risposta ad eventi stressogeni anche in altri tessuti. Tale effetto è transitorio, ma può provocare artefatti nei risultati degli studi, se non viene preso in considerazione. È stato notato, tuttavia, che un rimpiazzo solamente del 25% del terreno di coltura annulla gli effetti cellulari della perturbazione. [77]

Il tempo necessario per il completo differenziamento del monolayer (circa 21 giorni), è uno dei fattori che limita maggiormente l'efficienza dei modelli cellulari basati su Caco-2. Diverse metodologie di coltivazione sono state sviluppate per far fronte al problema. Una di queste è l'utilizzo di supporti 3D, l'applicazione di un flusso o una combinazione delle due, mediata dall'uso dei bioreattori, ma al momento tali strumenti non sono ancora standardizzati e, di conseguenza, utilizzabili su larga scala in ambito industriale.

In uno studio si è proceduto alla supplementazione con 2% siero fetale di vitello (sCS – supplemental Calf Serum) e una combinazione di fattori di crescita e ormoni che hanno permesso di ridurre la quantità di FBS (che normalmente si attesta attorno al 10%) e i costi di coltura. La variabilità nelle caratteristiche dell'FBS, inoltre, può portare ad uno sviluppo imprevedibile delle cellule. Con l'utilizzo di sCS sono stati sufficienti 4 giorni per il completo differenziamento del monolayer. Tuttavia, malgrado la comparsa di giunzioni strette, queste non sono risultate sufficientemente strutturate, causando l'aumentata permeabilità ad alcune molecole (come il Mannitolo). Le cellule, inoltre, non hanno sviluppato lo stesso numero di pompe di membrana rispetto alle colture canoniche.

In un lavoro successivo è stata addizionata al terreno di coltura, della puromicina. Questa molecola ha funzione antibiotica e si ipotizza che possa migliorare la compattezza epiteliale *in vitro* eliminando le cellule contaminanti, come i periciti. In questo esperimento le cellule Caco-2 hanno mostrato un completo differenziamento in 6 giorni di coltura e una buona affidabilità nel valutare la P_{app} di diversi composti. [78] [79]

In commercio è presente un sistema di coltura HTS (High throughput screening) pronto all'uso: il BioCoat®. Si tratta di un supporto che offre un array di inserti nei quali le membrane contengono già il medium ottimizzato per la tipologia di cellule da porre in coltura e sono rivestiti di materiali in grado di promuovere la proliferazione e l'adesione cellulare. In particolare, sono commercialmente disponibili kit che sfruttano rivestimenti in Collagene (tipo I o IV), Gelatina, Poli-lisina, Fibronectina, Laminina o Matrigel.

Il Caco-2 BioCoat Assay System, particolarmente adatto alla coltura di cellule Caco-2, sfrutta una membrana in PET, rivestita di collagene fibrillare, in un sistema a 24-well uniti in un'unica piastra.

L'impiego di questo strumento si è dimostrato vantaggioso in quanto, oltre a permettere la riduzione della quantità di siero utilizzato, minimizza il tempo necessario per la coltura a solamente 3 giorni. Inoltre, grazie alla consistenza delle caratteristiche fra lotti diversi dei KIT, i controlli sulla qualità del prodotto e la riduzione del rischio di errore dovuto alla manipolazione dell'operatore nel set-up dell'assay, risulta un metodo standardizzato sicuro e affidabile per la coltura, in grado di eliminare parte delle discrepanze nei risultati ottenute da laboratori diversi. Tuttavia, si tratta di un prodotto proprietario, dal costo elevato e, per questo, difficilmente sfruttabile su larga scala. [47] [80] [81] [82]

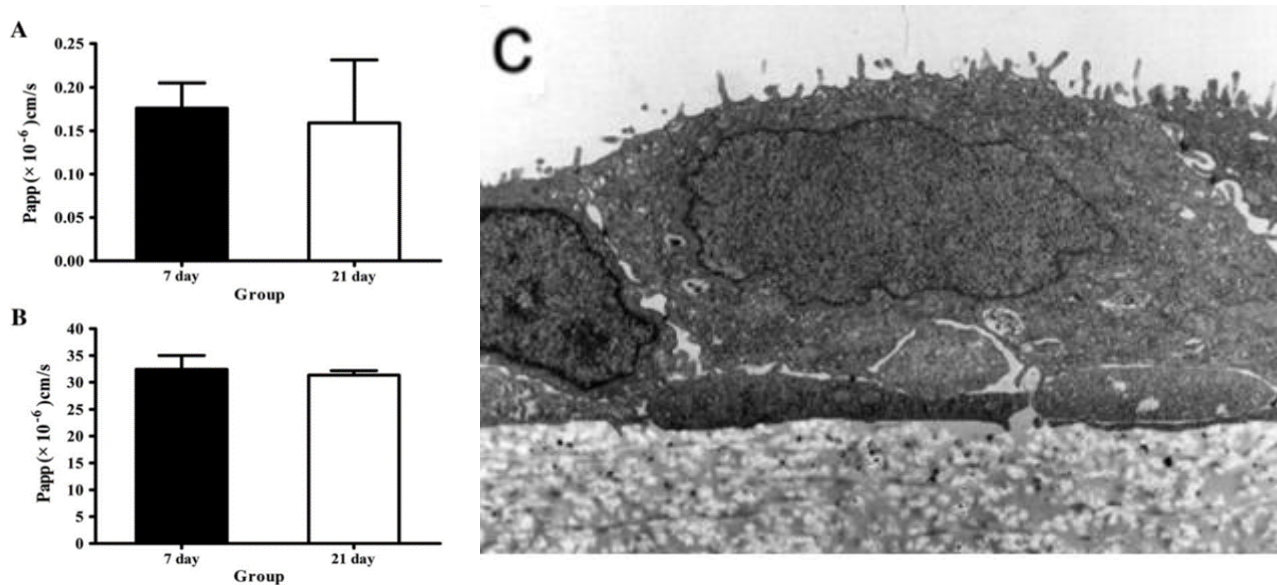


Figura 39 P_{app} relativa ad (A) Lucifer Yellow e (B) Propanolo nelle cellule trattate con il metodo di coltura standard, dopo 21 giorni (bianco) e quelle poste in coltura (nero) in un sistema BIOCOAT[®] HTS Caco-2 Assay modificato. (C) Monolayer formato dalle cellule Caco-2 nel Corning[®] BioCoat[™] Intestinal Epithelial Cell Environment ottenuto dopo soli 3 giorni di coltura.

3. Tessuto osseo

3.1 Anatomia e funzioni

L'apparato muscolo-scheletrico è deputato, in primo luogo, a rendere possibile il movimento del corpo. A tale scopo, le ossa fungono da segmenti rigidi che si connettono ai muscoli tramite strutture fibrose di tessuto molle: i tendini. Tramite la contrazione della muscolatura striata, i tendini trasmettono la forza generata alle ossa, provocando la variazione degli angoli articolari e permettendo, così, la locomozione e i movimenti.

Le ossa rivestono altre funzioni di particolare importanza come: la protezione dei tessuti sottostanti da possibili urti, la secrezione di molecole con funzione endocrina e paracrina e possono essere sfruttate dal corpo come riserva di minerali in caso di necessità di calcio, elemento di cui sono particolarmente ricche.

Il tessuto osseo presenta una preponderanza molto marcata di ECM rispetto alla componente cellulare. La matrice è un materiale composito, formato per il 50-70% da minerale inorganico, per il 20-40% da materiale organico e per il 3% da lipidi e acqua.

La componente minerale è dovuta alla presenza di cristalli di calcio e fosforo che si aggregano con una struttura simile a quella dell'idrossiapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$): materiale caratterizzato dall'elevata rigidità che fornisce alle ossa la loro tipica resistenza meccanica. Le fibre di collagene sono la principale componente della componente organica. Esse, presentano una struttura elicoidale gerarchicamente organizzata, la quale si forma attraverso un complesso processo che ha luogo, inizialmente, all'interno del nucleo di fibroblasti e osteoblasti, per poi proseguire nell'ambiente extracellulare, con un processo di autoassemblaggio delle fibrille. Intercalandosi fra queste ultime, i cristalli di idrossiapatite provvedono al processo di mineralizzazione ossea. I restanti componenti organici sono rappresentati da cartilagine e tessuto endoteliale.

La maggior parte delle ossa è composta da una struttura lamellare, che prevede l'organizzazione di strati concentrici di fibre di collagene mineralizzate, detti lamelle, attorno a canali Haversiani, i quali che permettono il nutrimento del tessuto attraverso la perfusione sanguigna (Figura 40). Le lamelle mostrano un'orientazione differente delle fibre fra i vari piani, fornendo proprietà meccaniche più vantaggiose all'osso. È stato dimostrato, inoltre, come tale orientazione si adatti in base alla direzione delle forze alle quali l'osso è sottoposto, minimizzando le tensioni generate dai carichi esterni.

La forma macroscopica stessa delle ossa è modellata sulla base della funzione che esse svolgono e vengono, perciò, distinte in diverse categorie. Le ossa lunghe (come femore, tibia, omero e ulna) in quanto leve vantaggiose, sono responsabili principalmente del movimento. Quelle piatte forniscono sostegno e protezione per gli organi interni, permettendo anche un certo grado di flessibilità (come le costole, che permettono l'espansione della cassa toracica). Le ossa tozze e irregolari (vertebre e ossa del carpo), infine, sono particolarmente adatte al trasferimento di carichi di compressione, mentre sono poco soggette a flessione, in virtù della loro geometria. La peculiarità che accomuna gran parte delle ossa (seppur in proporzioni differenti) è la presenza di un sottile stato esterno di osso corticale denso e compatto che riveste una parte interna, composta di osso spugnoso: più leggero e complessivamente elastico, poiché caratterizzato da una struttura reticolare intessuta dall'intreccio delle trabecole. Ciò permette di ottimizzare la resistenza ossea pur preservandone la leggerezza, relativamente al volume occupato. All'interno dell'osso spugnoso è ospitato il midollo osseo nel quale ha luogo l'ematopoiesi (processo che provvede alla maturazione di cellule sanguigne della linea bianca e rossa). [8] [83] [84] [85]

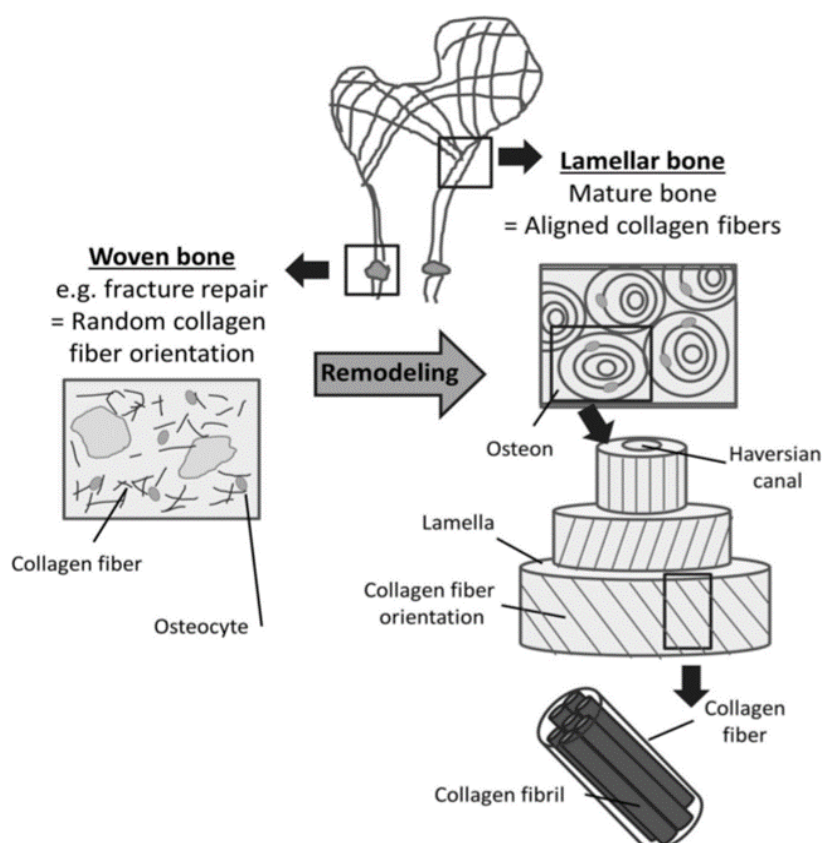


Figura 40 Struttura anatomica dell'osso, nella quale possono essere distinti pattern di orientazione differenti. Una disposizione casuale delle fibre intrecciate, spesso dovuta alla riparazione di una frattura, risulta meno resistente agli stimoli meccanici. Tuttavia, può andare incontro a rimodellamento, acquisendo la consueta forma lamellare dell'osso in condizioni fisiologiche.

Il processo di omeostasi ossea è un fenomeno di tipo dinamico che prevede un continuo rimodellamento mediato dalle diverse linee cellulari che si trovano all'interno del tessuto, ovvero: osteoblasti, osteociti e osteoclasti. Queste cellule adulte e differenziate hanno origine dalle cellule staminali mesenchimali (multipotenti) del mesoderma, dalle quali derivano anche gli adipociti, i condrociti delle cartilagini e dello stroma.

3.2 Cellule osee

Gli osteoblasti rappresentano il terzo e ultimo stadio di un processo di maturazione a tre step, che passa dagli osteoprogenitori ai preosteoblasti e, infine, alla cellula completamente differenziata, grazie alla presenza di diversi stimoli di tipo fisico-chimico (fra i quali la tensione meccanica e la via di segnalazione del Wnt). Le cellule completamente differenziate mostrano una morfologia cuboidale, mentre nei primi stadi è più simile a quella fusiforme e allungata dei fibroblasti. Gli osteoblasti hanno la funzione di secernere una matrice extracellulare proteica a base di collagene di tipo I, osteopontina, osteocalcina e fosfatasi alcalina, la quale subirà poi un processo di calcificazione, formando nuovi strati di tessuto osseo. [86]

Gli osteoclasti sono cellule multinucleate che provvedono alla demolizione e al riassorbimento del tessuto tramite la secrezione di sostanze acide ed enzimi litici, permettendone il successivo rimodellamento.

Gli osteociti rappresentano la popolazione cellulare preponderante (90-95%) all'interno della matrice ossea e possono vantare l'emivita più estesa (25 anni) all'interno del corpo umano. Derivano da osteoblasti rimasti intrappolati all'interno degli strati di tessuto neoformato e racchiusi in porosità denominate lacune, collegate fra loro dai canalicoli di Volkmann. Durante questo processo la secrezione di ECM si interrompe e subiscono profondi mutamenti sia la morfologia, che la funzione delle cellule. Rispetto agli osteoblasti, infatti, presentano un numero maggiore di canali ionici sulla superficie della membrana cellulare e una quantità più abbondante di actina a livello del citoscheletro. Inoltre, è stato osservato che essi rispondono a stress meccanici di taglio maggiori, mentre l'ambiente biomeccanico degli osteoblasti è meno definito.

Si pensa che gli osteociti abbiano la proprietà di avvertire il flusso di liquidi all'interno dei canalicoli e le deformazioni meccaniche imposte all'osso, tramite estroflessioni dendritiche che li mettono in comunicazione fra loro e con la morfologia della matrice. In risposta a tali stimoli gli osteociti sono in grado di secernere fattori di segnale paracrini ed endocrini coordinando, così, le azioni opposte delle altre due popolazioni cellulari. Il meccanismo tramite il quale gli osteociti esercitano la funzione di sensing dell'ambiente circostante non è ancora completamente compreso. [83] [85] [87]

3.3 Rimodellamento osseo

L'equilibrio dinamico fra l'azione degli osteoblasti e degli osteoclasti è essenziale per il mantenimento della morfologia e delle proprietà meccaniche fisiologiche dell'osso. Se alterato in favore degli osteoclasti, infatti, può portare a osteoporosi e fragilità, mentre un'eccessiva attivazione degli osteoblasti può provocare malformazioni e calcificazione dei tessuti molli (formazione ossea eterotopica). È noto che per evitare un eccessivo riassorbimento osseo è necessario sottoporre il tessuto a carichi ciclici in un range fisiologico. Con l'applicazione di carichi statici o troppo bassi si osserva, invece, la prevalenza del riassorbimento osseo ad opera degli osteoclasti; avvenimento che può verificarsi anche in seguito a carichi troppo elevati (sovra fisiologici), che provocano un eccesso di microfratture ai danni del tessuto. I meccanismi sottesi a queste evidenze sono ancora dibattuti e nel corso degli anni sono nate diverse teorie in merito.

I due principali fattori in grado di attivare il sistema di meccano-trasduzione osseo sono la deformazione della matrice e lo stress di taglio dovuto allo scorrimento del fluido all'interno delle porosità della ECM, entrambi risultati dovuti all'applicazione di forze esterne, come quella gravitazionale e di trazione dei muscoli.

La deformazione fisiologica (la cui applicazione permette di mantenere o aumentare l'integrità ossea) della matrice va da 0,03% a 0,15% tuttavia, è stato dimostrato che questi valori devono essere portati ad un range che va da 1% a 10% per ottenere lo stesso risultato *in vitro*. Questo effetto ha portato a ipotizzare che le cellule non avvertano direttamente la deformazione della matrice, ma quella microstrutturale che si genera nell'intorno delle cricche e delle lacune, dove l'interruzione della continuità del materiale concentra maggiormente le tensioni.

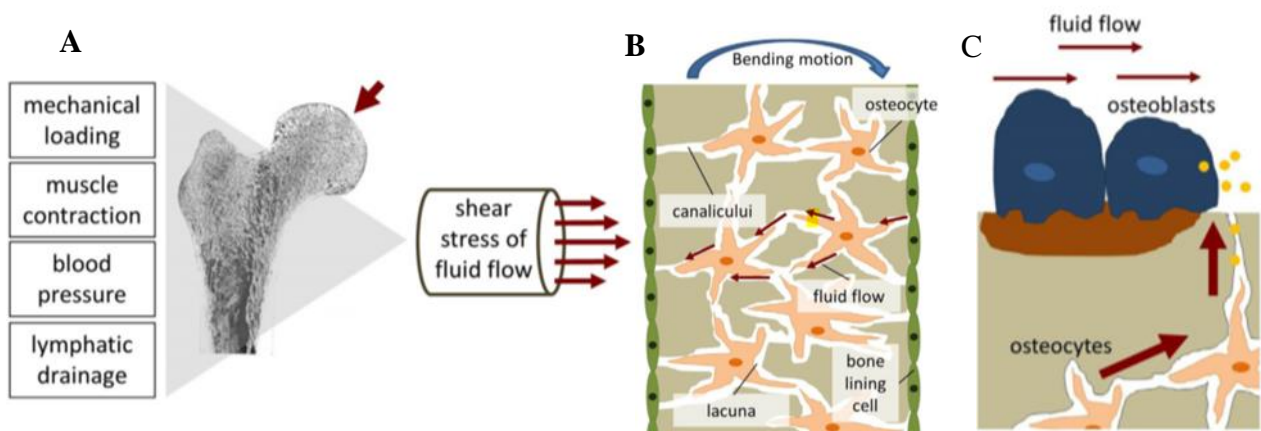


Figura 41 (A) Applicazione di diversi tipi di forze esterne che provocano (B) lo scorrimento del fluido interstiziale nei canalicoli e nelle lacune. Ciò provoca (C) sia la stimolazione diretta agli osteoblasti (anch'essi sensibili allo stress di taglio) e il rilascio di sostanze di regolazione da parte degli osteociti.

Lo stress di taglio ha dimostrato di provocare, in diversi studi *in vitro*, una risposta persino maggiore della deformazione della ECM nella modellazione del tessuto. Il fluido interstiziale, in seguito ad una sollecitazione dell'osso, viene sospinto, dal gradiente pressorio generato, all'interno dei canalicoli, delle lacune e delle porosità, andando a lambire le cellule (osteociti) che vi si trovano (Figura 41B). Essendo il diametro di tali canali particolarmente ridotto, il flusso acquisirà una velocità tale da causare uno stress di taglio sulle pareti che può andare da 0,8 a 3 Pa. La deformazione dovuta alla compressione, trazione e torsione dell'osso si rivela, perciò, lo stimolo meccanico per la circolazione del fluido (Figura 41A). Tuttavia, i due fenomeni esercitano stimolazioni di diversa natura: la deformazione della ECM, è avvertita principalmente dalle proteine di adesione che legano le cellule alla matrice, mentre il flusso ha un effetto diretto sulla membrana cellulare. [85] [83] [88] [89] [90]

3.4 Patologie ossee

L'osso possiede una grande capacità rigenerarsi in caso di frattura, senza presentare residui cicatriziali permanenti. L'aumento della longevità media della popolazione mondiale, tuttavia, ha causato un incremento considerevole di casi di fragilità ossea, legati a patologie correlate all'invecchiamento, che è indicato come la causa diretta della perdita del 15-30% della densità delle lacune, con la conseguente morte degli osteociti che risiedono al loro interno. La fragilità ossea è, a sua volta, un indice associato ad un rischio di mortalità aumentato e ad una diminuzione della qualità della vita. [91]

- ④ Osteoporosi: l'osteoporosi è una delle patologie ossee con il più alto grado di incidenza. È caratterizzata da una diminuzione sistemica di massa ossea e da modifiche strutturali, sia a livello macro che microscopico, dell'apparato scheletrico. I casi di osteoporosi sono classificabili come primari o secondari.

Nella definizione di osteoporosi primaria vengono incluse le forme post-menopausale (la tipologia più comune di osteoporosi), dovuta ad uno sbilanciamento ormonale degli estrogeni, causa di una rapida perdita di massa ossea; quella giovanile, che si manifesta in età infantile o adolescenziale ed è dovuta a mutazioni genetiche e quella senile nell'uomo. Le forme secondarie invece sono causate da patologie pregresse come la leucemia, la steatosi epatica e la sindrome di Cushing o dall'assunzione di specifici farmaci, come quelli contenenti glucocorticoidi, gli inibitori della pompa protonica e gli immunosoppressori sfruttati in caso di trapianto o chemioterapia.

A soffrire di questa patologia, in Italia, sono 3,5 milioni di donne e 1 milione di uomini ed è stato stimato che entro i prossimi 25 anni ne sarà affetto il 25% della popolazione over-65. All'osteoporosi è legato un forte incremento del rischio di frattura, soprattutto a livello dell'anca e delle vertebre, rispettivamente, con più di 90000 e 70000 casi diagnosticati annualmente. Mentre, in America, si contano più di 6 milioni di eventi traumatici simili ogni anno. Un evento di frattura improvviso legato alla fragilità ossea corrisponde ad un aumentato rischio di mortalità o ospedalizzazione a lungo termine e ad una conseguente diminuzione del livello di autosufficienza. L'impatto economico dell'osteoporosi in Italia corrisponde a 7 milioni di euro l'anno, 60% dei quali spesi per casi di frattura del femore. [84] [92] [93]

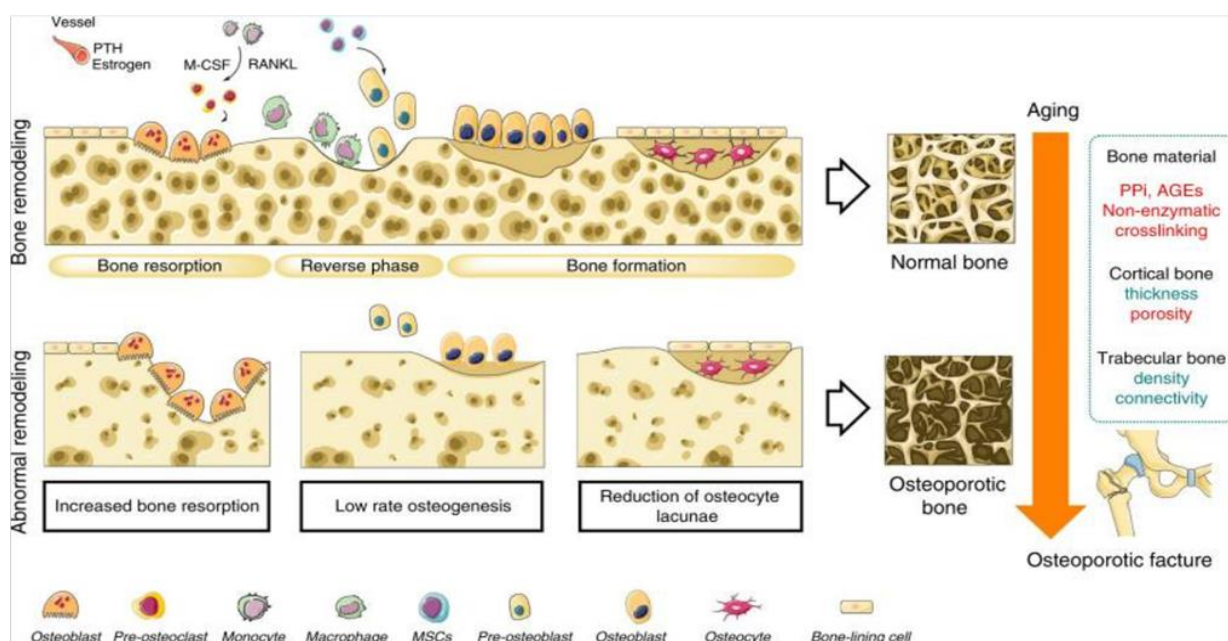


Figura 42 Processi di rimodellamento osseo fisiologico (attraverso il quale si forma l'osso sano) e patologico. In quest'ultimo caso si ha uno sbilanciamento fra azione degli osteoblasti (meno attivi) e degli osteoclasti (più attivi), che dà origine all'osso osteoporotico.

- ⊗ Osteoartrite: è una patologia degenerativa delle articolazioni che prevede il deterioramento delle cartilagini e il conseguente sfregamento delle superfici ossee fra loro. Ciò causa dolore, restrizione nei movimenti e rigidità articolare. I fattori di rischio sono, in gran parte, sovrapponibili a quelli dell'osteoporosi, con una particolare associazione fra possibile insorgenza della malattia e alcuni aspetti dello stile di vita, come il livello di attività fisica e l'alimentazione. [84]
- ⊗ Osteomielite: si tratta di uno stato infiammatorio dell'osso dovuto, nella maggior parte dei casi, ad un'infezione batterica. La causa principale di osteomielite è l'instaurarsi di batteri all'interno dell'apparato scheletrico, fra i quali il più noto è *S. aureus*, che presenta un alto grado di

resistenza agli antibiotici. Altri agenti infettivi che possono scatenare la cascata infiammatoria sono alcune specie di funghi, ma tale reazione può avere anche un'insorgenza spontanea della quale ancora non sono chiare le cause. Gli effetti sono invalidanti e si esprimono con un rimodellamento osseo patologico che causa una morfologia scheletrica alterata. [94]

④ Osteomalacia: il termine osteomalacia significa “osso morbido” e tale patologia si manifesta come una mancata mineralizzazione del tessuto osseo, che rimane cartilagineo. Le cause riconosciute come quelle più frequenti sono un deficit di vitamina D o di calcio, l'assunzione di alcuni farmaci e malattie pregresse o congenite. [95]

④ Osteogenesis imperfecta: si tratta di un insieme eterogeneo di stati patologici ereditari a carico dei tessuti connettivi. Questo raro disordine è presente in un caso su 15-20000 nascite e causa una generalizzata fragilità e una scarsa crescita dell'apparato osseo. Le cause dell'osteogenesis imperfecta, secondo recenti studi, sono da ricercare in mutazioni dei geni implicati nella produzione di collagene. [96]

3.5 Modelli osteogenici

Come precedentemente accennato, i meccanismi che sottendono all'omeostasi ossea non sono ancora completamente compresi nella loro base molecolare. Modelli precisi, sviluppabili *in vitro* e a basso costo, potrebbero permettere l'avvicinamento ad una visione più completa dei meccanismi che portano allo sviluppo delle patologie, particolarmente invalidanti, in grado di intaccare l'apparato scheletrico e delle leggi biologiche che guidano la continua modellazione ossea in ambito fisiologico.

Lo sfruttamento di modelli *in vivo* propone problemi etici e di trasferibilità dei risultati nell'uomo, mentre quelli *ex vivo* non sono in grado di riprodurre il preciso comportamento dell'osso, a causa del rapido deterioramento dei tessuti molli che lo compongono e dell'irrigidimento (causa di aumentata fragilità) della struttura mineralizzata dovuto alla disidratazione dei campioni e alle procedure di conservazione e fissazione.

Attraverso la ricerca in campo tissutale, inoltre, i modelli sviluppati *in vitro* potranno, una volta perfezionati e standardizzati, fornire un importante contributo per lo sviluppo di graft impiantabili in grado di correggere stati patologici, dovuti ad eventi traumatici o a malformazioni congenite. Già ora, l'osso è il secondo tessuto più trapiantato al mondo con oltre 2 milioni di interventi di ricostruzione ossea effettuati. Le procedure odierne prevedono l'utilizzo di graft autologhi (che rappresentano il gold standard), allogenici o costruiti con materiali artificiali metallici o ceramici.

Tuttavia, la quantità di graft autologhi disponibili per il trapianto è limitata, poiché l'operazione di raccolta del tessuto potrebbe provocare un danno nel sito di origine. Per i trapianti allogenici si ha a

disposizione una grande quantità di tessuti sani, ma sussiste il rischio di rigetto e trasmissione di infezioni dal donatore al ricevente. I materiali da impianto di natura metallica possono risentire di problemi nell'integrazione con l'organismo del paziente, causando infezioni e degradandosi in modo imprevisto a causa dell'aggressivo ambiente biologico. Le ceramiche, pur presentando una struttura particolarmente biocompatibile e in grado di minimizzare gli effetti delle frizioni causati da parti le cui superfici sono esposte a sfregamento, sono di natura fragile. A causa di torsioni e urti possono arrivare a rottura improvvisa. L'opzione più desiderabile risulta, perciò, quella di sfruttare strutture con caratteristiche perfettamente sovrapponibili, sotto ogni punto di vista, a quelle dell'osso nativo, che siano disponibili in tempi brevi e modellabili in base alla fisiologia del paziente specifico. Per raggiungere questo scopo uno dei metodi proposti in campo tissutale è quello di generare uno scaffold sul quale saranno fatte proliferare cellule osteogeniche in grado di secernere una matrice mineralizzata. Successivamente il complesso di biomateriale e cellule verrà impiantato e queste ultime provvederanno a sostituire lo scaffold (che andrà incontro a degradazione) con la loro ECM, rigenerando la continuità ossea fisiologica.

Per tale impiego (e per lo sviluppo di modelli *in vitro* non ai fini di impianto, ma di ricerca) sono state proposte svariate tipologie di cellule ossee, che possono avere origine da tre diverse fonti:

- ④ Cellule staminali pluripotenti (con la capacità di acquisire, tramite differenziamento, diversi fenotipi, fra i quali quello osteoblastico), come le cellule mesenchimali.
- ④ Osteoblasti e osteoclasti adulti isolati da diverse fonti animali o umane.
- ④ Linee cellulari immortalizzate o provenienti da tumori ossei (osteosarcomi). [85] [91]

La maggior parte dei modelli osteogenici *in vitro*, tuttavia, soffre ancora di alcune problematiche che ne precludono la standardizzazione e la commercializzazione su larga scala. La composizione ottimale del terreno di coltura per stimolare il processo di differenziamento è ancora un tema dibattuto. Nei diversi studi svolti, infatti, è evidente una mancanza di omogeneità nella proporzione dei principali reagenti sfruttati per ottenere il fenotipo adulto delle cellule osteogeniche. Molti dei terreni di coltura utilizzati contengono FBS che, di per sé, è un composto caratterizzato da una grande variabilità fra diversi lotti di produzione e ciò può influenzare il risultato della coltura. Inoltre, l'FBS può notoriamente contenere xeno-antigeni di provenienza animale che possono influenzare il processo di differenziamento. È dimostrato che il potenziale osteogenico di cellule mesenchimali coltivate con una tipologia di terreno di coltura xeno-free, viene mantenuto efficacemente e il tempo necessario per acquisire il fenotipo definitivo è minore, rispetto a controlli che sfruttano un terreno di coltura con FBS addizionato. [97] [98] [99] [100]

Nel caso di utilizzo di cellule mesenchimali, inoltre, è da tenere in considerazione la provenienza (midollo osseo, tessuto adiposo, cordone ombelicale) e il metodo di isolamento di tali cellule, poiché potrebbero influire sul processo di sviluppo. A tali fonti di variabilità si aggiungono altri fattori potenzialmente influenti sul comportamento cellulare staminali *in vitro*, come l'età e lo stato di salute del donatore. Queste, inoltre, una volta isolate, tendono a perdere rapidamente (già dopo pochi passaggi) il loro potenziale di differenziamento, rendendo difficoltosa l'espansione fuori dall'ambiente nativo e, perciò, l'ottenimento di un numero rilevante di cellule.

Alcune delle problematiche di inomogeneità derivanti dall'utilizzo di cellule mesenchimali può essere risolto con l'impiego di linee cellulari in grado di replicarsi facilmente e indefinitamente, ma anch'esse presentano differenze evidenti in base ai metodi di coltura. Inoltre, proprio la loro natura neoplastica, costituisce una discrepanza importante nella riproduzione *in vitro* del tessuto osseo.

Un elemento di centrale importanza per qualsiasi tipologia di cellula sfruttata per l'allestimento di un modello *in vitro* riguarda la piattaforma di supporto e adesione del materiale biologico. A causa delle specifiche caratteristiche dell'ambiente in cui si sviluppa questo tessuto, infatti, i modelli in questione non possono prescindere dal riprodurre, fra le diverse variabili, una struttura tridimensionale accuratamente studiata dal punto di vista morfologico e meccanico. Ciò comporta un'attenta selezione della geometria del supporto (non solo quella superficiale ma anche fattori come la porosità e il grado di interconnessione dei pori stessi) e del biomateriale utilizzato per generarlo.

È stato evidenziato in diversi studi, infatti, come una matrice composta da idrossiapatite (HA) e collagene sia in grado di indirizzare cellule mesenchimali verso un fenotipo osteogenico, mentre uno scaffold in HA e hydrogel sintetico, permette di far virare il differenziamento verso un fenotipo condrogenico.

3.6. Cellule MC3T3-E1

Le cellule primarie MC3T3 sono state isolate, originariamente, dal cranio di topo. Da esse è stata sviluppata, tramite immortalizzazione, la linea cellulare clonale delle MC3T3-E1, selezionata in base all'alta attività di fosfatasi alcalina (ALP) presentata nello stato confluento. Tutt'ora, questa linea è fra le più sfruttate per la riproduzione *in vitro* del tessuto osseo. Le MC3T3-E1, nello stadio di crescita logaritmica si trovano nello stato di osteo-progenitori ed esprimono una morfologia simile a quella dei fibroblasti, caratterizzati da un citoscheletro con abbondanti microtubuli e microfilamenti nel citoplasma. Dimostrano un doubling-time di 18 ore e possono raggiungere lo stato confluento in 4

giorni, dopo i quali cominciano a formarsi più strati cellulari sovrapposti. Con il protrarsi della coltura, i filamenti di collagene secreti dalle cellule si allungano e aumentano di diametro. Dopo circa 21 giorni le cellule dimostrano un fenotipo tipicamente osteoblastico e tendono a raggrupparsi in regioni nodulari circondate da matrice fibrosa. Quest'ultima, proseguendo con la coltura, comincia a mineralizzarsi ed è possibile osservare i primi cristalli aghiformi intercalati alle fibre. Dopo 40-50 giorni si notano agglomerati calcificati, formati da idrossiapatite ben strutturata, nei quali sono distinguibili gli osteociti, intrappolati all'interno della matrice, come avviene *in vivo*.

Le cellule MC3T3-E1 hanno dimostrato un'espressione del proprio fenotipo osteoblastico in tempi minori, oltre ad essere in grado di mantenerlo più a lungo quando il monolayer viene sottoposto ad uno stimolo perfusivo. Tuttavia, diversi metodi di coltura più sofisticati rispetto alla semina su supporti bidimensionali sono stati sviluppati nel corso degli anni. [101] [102]

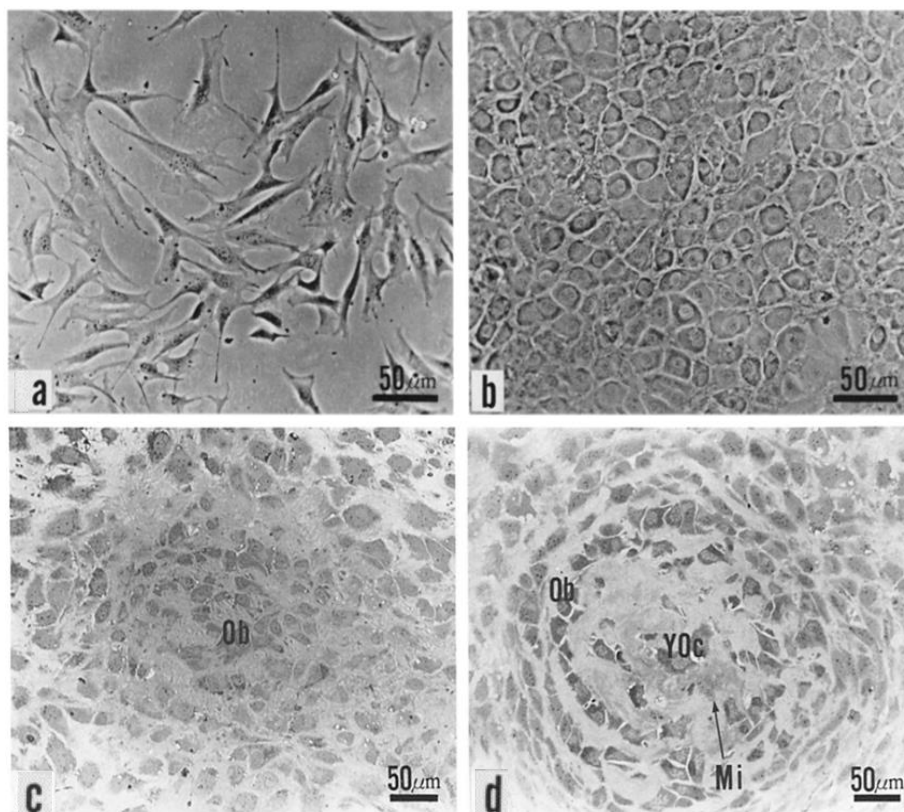


Figura 43 Immagini ottenute tramite microscopia a contrasto di fase nelle quali è possibile osservare cellule MC3T3-E1 dopo 2, 4, 21 e 24 giorni di coltura (rispettivamente a-b-c-d). Inizialmente le cellule (a) acquisiscono una morfologia fusiforme, tipica dei fibroblasti, successivamente (b) si differenziano verso un fenotipo osteoblastico (c) riunendosi in noduli attorno ai quali si sviluppa la matrice mineralizzata. Infine, (d) gli osteoblasti intrappolati nella matrice stessa diventano osteociti. Ob: osteoblasti. YOC: giovani osteociti. Mi: matrice mineralizzata.

3.6.1 Assays osteogenici

I risultati del processo di differenziamento *in vitro* possono essere osservati attraverso diverse tipologie di assays spettrofotometrici. La reazione di Von Kossa è un metodo d'indagine qualitativo che permette di visualizzare i depositi di calcio presenti all'interno della matrice mineralizzata. Si basa sulla sostituzione, da parte di ioni di argento, del calcio legato al fosfato nei cristalli di HA. La successiva visualizzazione è permessa dalla riduzione degli ioni in argento metallico. Attraverso questo assay sarà, quindi, possibile osservare la matrice sotto forma di agglomerati dalla colorazione che vira dal giallo al nero, in base alla dimensione dei grani d'argento e al tempo di esposizione all'agente riducente.

Inizialmente, la reazione di Von Kossa prevedeva l'utilizzo di argento nitrato come donatore di Ag^+ ma, successivamente, tale reagente è stato sostituito con argento lattato che, in virtù del suo minore coefficiente di dissociazione, permette di diminuire la probabilità di reazioni non specifiche.

Questa migioria ha aumentato la capacità di discriminazione del test, diminuendo la possibilità di colorazione indesiderata del background. [97] [103]

Una seconda possibilità è quella rappresentata dall'utilizzo di Alizarin Red S (ARS). Questo colorante è in grado di reagire con il calcio, formando depositi dalla colorazione rossa che possono, successivamente, essere estratti utilizzando acido acetico (possibilità che rende l'ARS assay particolarmente versatile). Il colorante così estratto può essere osservato attraverso tecniche di microscopia ottica a contrasto di fase o quantificato attraverso tecniche spettrofotometriche a 405 nm. Il protocollo standard per questo tipo di assay prevede la rimozione del medium di coltura ed eventuali suoi residui attraverso un lavaggio delle cellule con HEPES o altri buffer salini. Successivamente le cellule vengono fissate con un processo di incubazione di 15 minuti in formaldeide, che verrà poi lavata con dH_2O (acqua distillata). Si procede con l'aggiunta di ARS (a pH 4,2) nei pozzetti e l'agitazione della piastra per 20-30 minuti. Dopodiché è necessario effettuare un ulteriore lavaggio con dH_2O per eliminare il colorante che non ha reagito. Infine, è possibile passare all'ispezione del campione. L'ARS assay è stato applicato con successo a diverse tipologie di cellule osteogeniche disposte su un monolayer, fra le quali cellule staminali mesenchimali e linee cellulari di origine tumorale dimostrandosi, inoltre, in grado di diagnosticare tumori mineralizzanti in campioni derivanti da biopsia. [104]

Un ulteriore metodo utilizzabile è il saggio di ALP, che sfrutta la spettrofotometria per misurare i livelli di ALP (fosfatasi alcalina), molecola riconosciuta come una dei più rilevanti marcatori dell'attività osteoblastica. In questo caso il 4-nitrofenilfosfato viene impiegato come substrato per

l'ALP, che ne provoca la defosforilazione, spingendolo ad assumere una colorazione gialla, individuabile alla lunghezza d'onda di 405 nm.

Questo metodo è particolarmente sensibile e riproducibile, tuttavia, i protocolli di conservazione e preparazione del campione da analizzare possono influenzarne i risultati. È stata dimostrata, infatti, una dipendenza della cinetica e della precisione dell'assay dalla concentrazione cellulare ed enzimatica del campione. [97]

3.6.2 Supporti di coltura 3D e dinamici per MC3T3-E1

In diversi studi è stata evidenziata una maggiore vitalità e capacità di proliferazione di cellule osteogeniche su supporti tridimensionali, nei quali la coltura può espandersi su più strati dello scaffold, senza essere limitata alla formazione di un monolayer: conformazione particolarmente distante della reale morfologia ossea. Una recente sperimentazione ha, inoltre, evidenziato come il materiale e la tessitura stessa delle fibre che compongono lo scaffold, siano fattori determinanti nella proliferazione delle cellule MC3T3-E1. In questo studio è stata sfruttata la tecnologia della stampa 3D FDM (fused deposition modeling), in una sua versione ad estrusione a bassa temperatura, per costruire due strutture composite: una in fibroina della seta/collagene/idrossiapatite (SF/COL/HA) e la seconda in policaprolattone/idrossiapatite (PCL/HA). Ognuno degli scaffold presentava 6 strati di fibre allineate, sovrapposti secondo tre diverse angolazioni l'uno rispetto all'altro: 30°, 45° e 90°. (Figura 44)

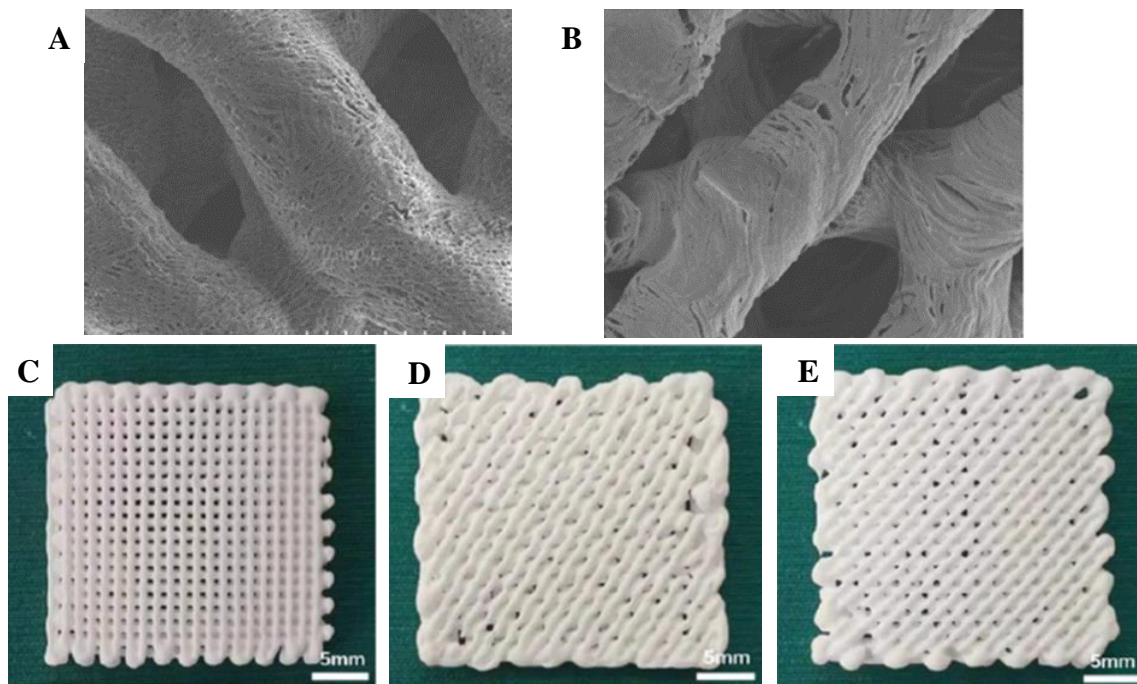


Figura 44 Immagini al SEM delle fibre degli scaffold di SF/COL/HA e (B) PCL/HA. (C-D-E) fotografie dello scaffold PCL/HA nelle versioni con fibre rispettivamente a 90°, 45° e 30°

Entrambi gli scaffold hanno dimostrato di incentivare la proliferazione e la sopravvivenza delle cellule con le quali sono stati colonizzati, ma le versioni con angolazione a 90° hanno fornito un ambiente più vantaggioso. Questo risultato è attribuibile, in gran parte, al modulo di compressione dimostrato dalla specifica disposizione delle fibre, ma anche alle diverse interconnessioni formate fra le porosità e alla densità superficiale ottenuta. Il dispositivo di supporto presentato può fornire una possibile soluzione di impianto, grazie all'utilizzo di materiali polimerici biocompatibili e di origine naturale. Tuttavia, sono stati studiati anche altri tipi di biomateriali impiegabili in tale ambito. Sono stati testati *in vitro* scaffold in lega di Fe-Mn (attraverso inkjet 3D printing), che hanno dimostrato una buona biocompatibilità anche durante la fase di degradazione permettendo, inoltre, la colonizzazione cellulare degli strati più interni. Il vantaggio delle leghe metalliche è rappresentato, principalmente, dalle loro proprietà meccaniche particolarmente simili a quelle dell'osso, ma saranno necessari ulteriori studi sull'ambiente *in vivo*, per risolvere problematiche legate alla corrosione e ai suoi sottoprodotti. [105] [106]

Per la costruzione di scaffold tridimensionali la stampa 3D rappresenta uno dei metodi produttivi più promettenti, tuttavia, la tecnologia FDM non è in grado di generare strutture ad alta porosità che mantengano, allo stesso tempo, una buona integrità, sufficienti dettagli morfologici superficiali e un alto rapporto superficie/volume. Altre metodologie come il solvent casting and particulate leaching (SCPL), sono state esplorate e, malgrado quest'ultima tecnica sia in grado di sopperire a gran parte delle mancanze della FDM, la stampa di scaffold dalla forma complessa risulta ancora difficoltosa e richiede un passaggio di post-processing dispendioso per rimozione dei residui di acqua e solventi.

In uno studio del 2019 è stato proposto un nuovo processo produttivo che ha permesso la costruzione di uno scaffold anatomicamente accurato (che riproduce la forma di un femore umano) in acido polilattico (PLA) e idrossiapatite (HA). In questo caso è stato prodotto uno stampo idrosolubile in PVA (alcol polivinilico) dello scaffold attraverso stampa 3D, dal quale si è ricavata la struttura in PLA-HA (Figura 45). Successivamente le due componenti sono state sottoposte a un processo di perfusione per ottenere la dissoluzione dello stampo e il lavaggio dello scaffold. Il supporto risultante ha presentato un grado ottimale di uniformità dei pori e ha permesso l'adesione di cellule MC3T3-E1 le quali hanno dimostrato un alto grado di attività metabolica.

Questa nuova tecnica produttiva deve essere ancora validata attraverso una perfusione di medium per il sostentamento delle cellule, a lungo termine, anche negli strati più profondi. Tuttavia,

il tempo necessario alla generazione dello scaffold, risulta 20 volte più minore rispetto a quello impiegato tramite FDM e il rapporto superficie/volume migliorato di un fattore 31. [107]

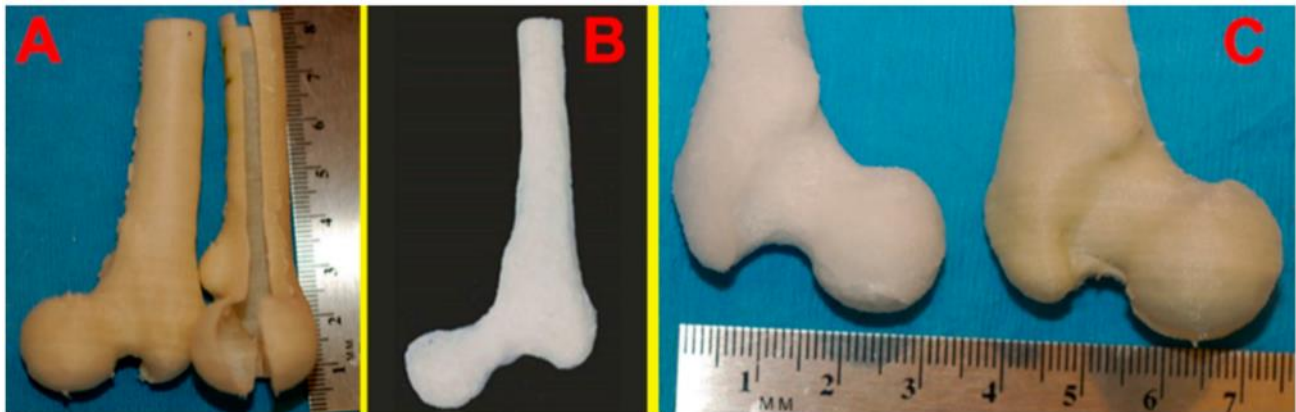


Figura 45 (A) Stampi stampati in 3D in PVA, uno dei quali è stato appositamente inciso per mostrare la parte interna. (B) Scaffold completamente formato. (C) Comparazione fra lo stampo e lo scaffold, che ne riproduce fedelmente la morfologia.

Come precedentemente accennato, oltre alla tridimensionalità del modello, è necessario fornire segnali di tipo meccanico alle cellule e la generazione di un flusso è uno dei metodi più sfruttati per farlo. È stata valutato, in un lavoro del 2013, l'effetto su cellule MC3T3-E1, dello stress di taglio di 12 dyne/cm^2 (1,2 Pa) indotto da flusso e protratto per una sola ora.

Questo segnale meccanico ha immediatamente indotto un incremento nel numero di fibre di ancoraggio di F-actina e un loro riarrangiamento. Poiché le proteine strutturali del citoscheletro sono collegate direttamente alla membrana cellulare, si è ipotizzato che una deformazione della morfologia cellulare potesse alterare l'espressione genica delle MC3T3-E1.

È stata studiata, perciò, l'espressione di geni come RUNX2, COX-2 e ALP implicati nel processo di differenziamento cellulare verso un fenotipo osteoblastico. La sovra regolazione dei primi due è stata rilevata nelle prime 24 ore, mentre l'attività di ALP è aumentata nel range temporale fra dalle 48 alle 72 ore. I risultati riguardanti l'espressione genica si sono tradotti in una maggiore deposizione di fibre di collagene e in una più rapida formazione di noduli mineralizzati.

Ciò dimostra che anche un breve stimolo perfusivo è sufficiente ad incentivare il differenziamento verso lo stato completamente differenziato delle cellule MC3T3-E1. [108]

Per lo sviluppo di un flusso continuativo nel tempo, sono spesso sfruttati dispositivi a perfusione che prendono il nome di parallel-plate flow chamber (PPFC). Questi, permettono un assaggio controllato di fluido all'interno di una camera, attraverso l'azione propulsiva di una pompa a siringa. Le PPFC sono strumenti di semplice utilizzo e lo shear stress sviluppato sul substrato cellulare e sulle pareti è costante. Tuttavia, la velocità del flusso non è modulabile durante la fase di perfusione e risulta difficile produrre uno stress di taglio particolarmente contenuto, che rimanga nell'ordine dei

μPa . Il dispositivo ideato da un gruppo di ricerca cinese (Figura 46a-b) sfrutta una modifica della tecnologia PFC per la generazione di un flusso di intensità variabile che imponga uno shear stress sulle MC3T3-E1 che vada da 1,5 a 412 μPa . Questo studio risulta di particolare rilevanza, poiché tali valori di stress di taglio sono comparabili con quelli ottenuti nel nostro lavoro sperimentale: 3,54-16,6 μPa . Il design del chip microfluidico prevede quattro camere delle dimensioni di $4265 \times 1265 \times 100 \mu\text{m}$, nelle quali scorreranno flussi di terreno di coltura nell'ordine dei $\mu\text{l}/\text{min}$ per generare lo stimolo. Il flusso viene modulato attraverso la differente lunghezza e sezione dei microcanali che connettono le camere all'inlet e all'outlet del dispositivo. Con una perfusione di 0,08 $\mu\text{l}/\text{min}$ è stato possibile ottenere stress di taglio nelle 4 camere, rispettivamente dalla 1 alla 4, di 1,5 7,7, 52,6 e 412 μPa .

Dopo 48 ore, sono stati raccolti i risultati, tramite i quali è stato possibile constatare come nelle prime tre camere (fino a 52,6 μPa), sia aumentato il tasso di proliferazione e differenziamento delle cellule, le quali hanno espresso più alti livelli di ALP e RUNX2, mentre nella quarta (412 μPa) lo sviluppo del fenotipo e della quantità di cellule vitali sia stato inibito (Figura 46e-h).

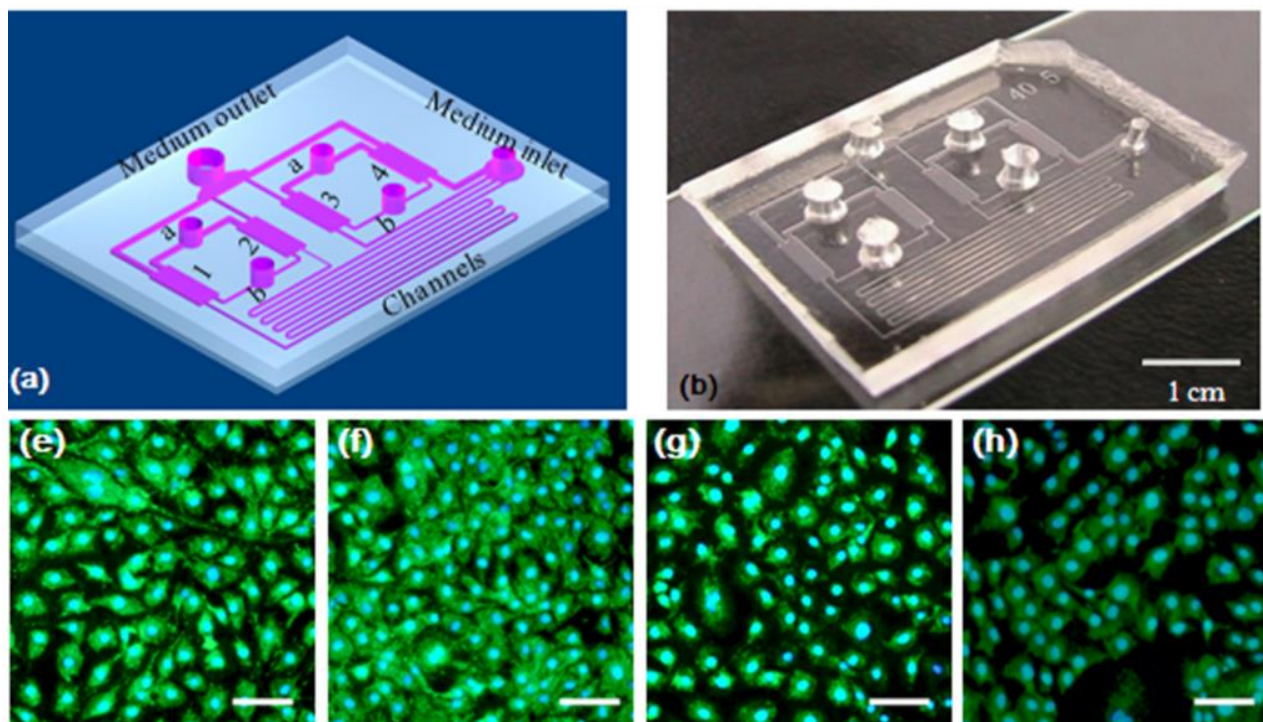


Figura 46 (a) Modello CAD del chip in grado di supportare diverse velocità del flusso alle camere di coltura (1, 2, 3 e 4). (b) Fotografia del dispositivo. (e-h) cellule MC3T3-E1 nelle camere, rispettivamente da 1 a 4 dopo 48 ore di perfusione, visualizzate tramite colorazione con Rh123-Hoechst-PI.

In un ulteriore studio in regime di perfusione, tuttavia, viene fatto notare come la proliferazione (legata al numero di cellule vitali) e il differenziamento (processo legato allo sviluppo di un fenotipo adulto e ben definito) siano due avvenimenti distinti e non spesso concomitanti. Infatti, è stato dimostrato che, sottoponendo cellule MC3T3-E1 pre-osteoblastiche in fase G0/G1 del ciclo cellulare

ad uno stress di taglio indotto dal flusso, la proliferazione viene interrotta, dando il via al processo di differenziamento, con un corrispettivo innalzamento dei livelli di Runx2. [109]

La possibilità di somministrazione di un flusso di terreno di coltura continuo ed uniforme non è l'unica opzione di stimolazione percorribile. Infatti, diversi studi hanno sottoposto le cellule MC3T3-E1 a un flusso di tipo pulsatile. È stata recentemente indagata la relazione fra un ambiente di coltura caratterizzato da un flusso pulsatile e la morfologia delle cellule con particolare attenzione alle variazioni nel volume del nucleo, in risposta alla perfusione. Per tale osservazione sono state sottoposte le cellule MC3T3-E1 a 1 ora di flusso pulsatile (shear stress di 1 Pa ad una frequenza di 1Hz). Sono state raccolte immagini delle cellule ogni 10 minuti durante la perfusione e subito dopo, permettendo lo studio, tramite software apposito (MeasureStack), dei parametri morfometrici.

La forma delle cellule è passata da quella tipicamente poligonale degli osteoblasti a una più triangolare mentre il nucleo, inizialmente tondeggiate, ha subito un allungamento. Il flusso ha causato, inoltre, una diminuzione dell'area cellulare di un fattore di 0,3 e del volume del nucleo di un fattore 0,2 (Figura 47). Le strutture fibrose di α -tubulina del citoscheletro hanno risposto allo stimolo assumendo una conformazione meno allineata, con un corrispondente incremento dei livelli di espressione di F-actina. Come già accennato, l'ancoraggio di queste proteine strutturali al nucleo causa una modulazione diretta dell'espressione genica della cellula e, in questo caso, si è osservato un incremento nella formazione di collagene a 3 settimane dall'imposizione del flusso. [102]

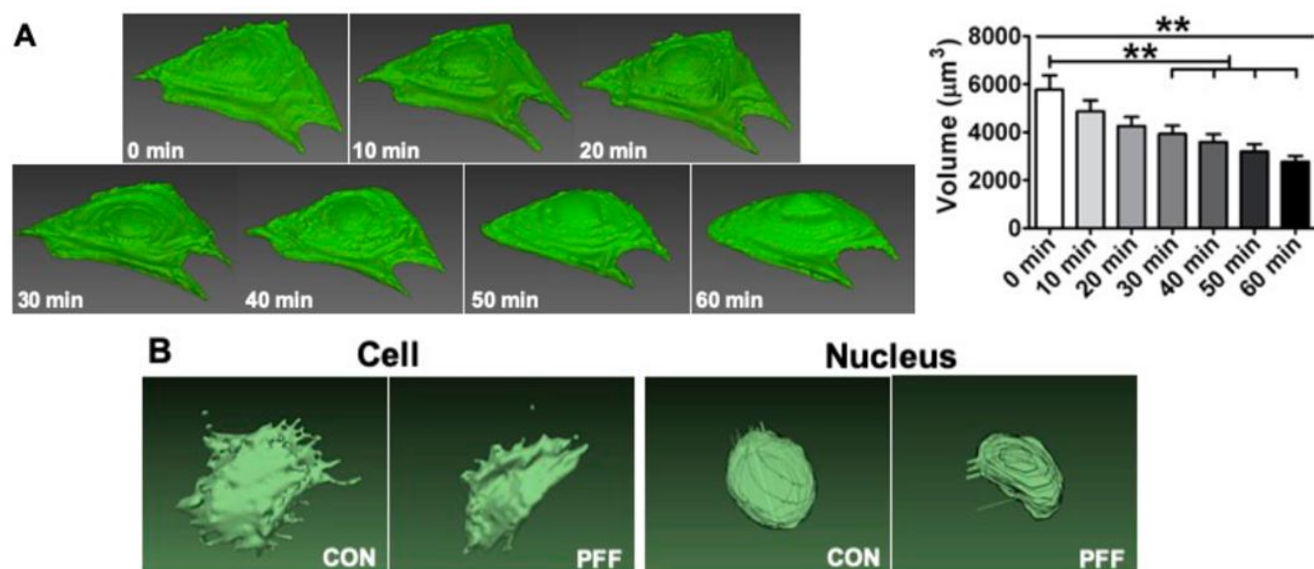


Figura 47 (A) Ricostruzione 3D della morfologia cellulare sottoposta al flusso pulsatile per intervalli temporali successivi e istogramma che riporta il volume cellulare rilevato negli stessi istanti. **(B)** Morfologia della cellula e del nucleo nella coltura statica di controllo (CON) e al termine della perfusione pulsatile (PFF).

Oltre alla morfologia e all'espressione di specifici geni, le cellule sottoposte a flusso pulsatile hanno dimostrato un aumento del rilascio di molecole di segnale, quali Ossido nitrico (NO) e Prostaglandina E₂ (PGE₂), entrambe legate alla formazione ossea meccanicamente indotta. La reazione di linee cellulare osteoblastiche (MC3T3-E1) e osteocitiche (MLO-Y4), è risultata differente in risposta alla stimolazione in regime perfusivo pulsatile (anche se protratto per soli 10 minuti). La disparità di maggior rilievo fra le due popolazioni riguarda il rilascio di PGE₂ che, negli osteoblasti, è maggiore nel caso in cui il citoscheletro sia stato precedentemente danneggiato (condizione indotta chimicamente nello studio in questione), probabilmente a causa della stimolazione delle adesioni focali che si formano in tale condizione; mentre negli osteociti la secrezione di PGE₂ viene inibita dalla condizione di compromissione del citoscheletro. Tale scoperta può essere attribuibile alla maggior dipendenza degli osteociti dalla grande quantità di actina che ne caratterizza il citoscheletro (Figura 48). La comprensione di questi meccanismi potrebbe aiutare ad aggiungere nuove conoscenze riguardo alla modellazione scheletrica e all'interazione fra le diverse popolazioni cellulari ossee. [110]

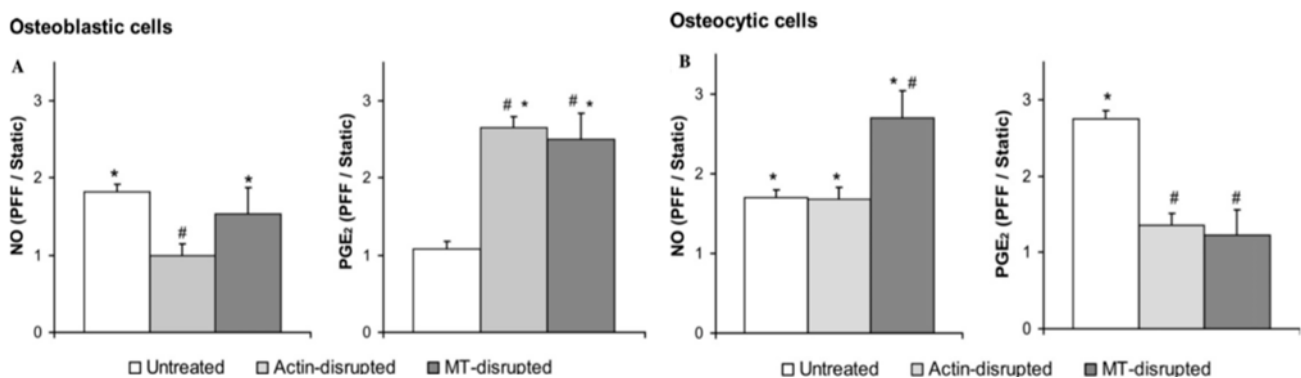


Figura 48 Livelli di NO e PGE₂ secreti dalle cellule (A) osteoblastiche MC3T3-E1 e (B) osteocitiche MLO-Y4 nelle condizioni (bianco) senza trattamento (grigio chiaro) con aggiunta di una molecola in grado di deteriorare l'actina e (grigio scuro) microtubuli (MT) del citoscheletro.

Nei modelli osteogenici più completi la conformazione geometrica tridimensionale degli scaffold è stata unita allo stimolo impresso dal flusso. Le colture statiche su scaffold sono in grado di supportare efficacemente la vitalità e la proliferazione cellulare sulla superficie della struttura ma, se il suo spessore è maggiore di 2mm, il core rischia di andare in necrosi a causa della sua mancata perfusione. Per ovviare a questa problematica è stato costruito un bioreattore in grado di assicurare la vitalità cellulare in scaffold dello spessore fino a 6mm. Il dispositivo in questione è stato equipaggiato di 8 camere indipendenti, che possono ospitare scaffold fino a 24mm di diametro e 10mm di spessore (Figura 49). Attraverso di esse il flusso di medium (1 ml/min) è stato sospinto per mezzo di una pompa peristaltica ad 8 canali che ha provocato uno stress di taglio all'interno delle porosità dello scaffold di 0,02 dynes/cm² (2 mPa). L'entità del flusso è stata mantenuta volutamente a valori subfisiologici per

non provocare un danno alla coltura e per escludere la possibilità di esercitare una forza meccanica rilevante sulle cellule, in quanto l'obiettivo era quello di valutare solamente l'effetto della perfusione e del ricambio di nutrienti nel core.

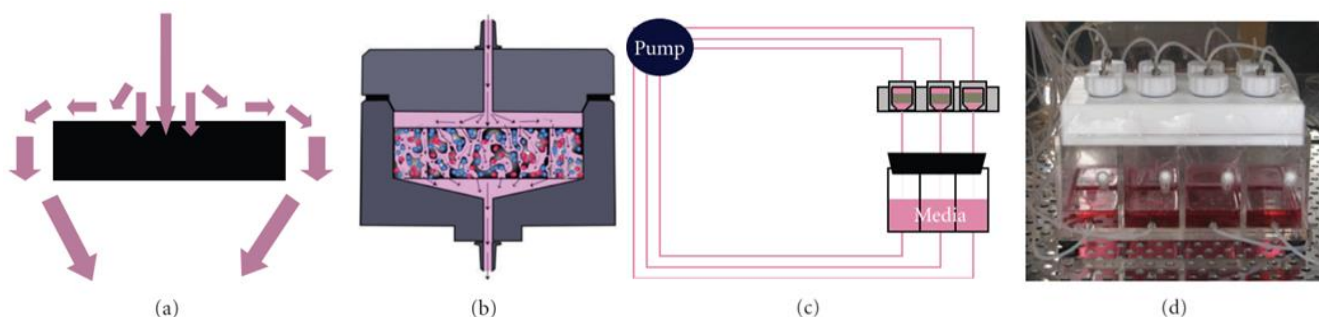


Figura 49 (a) Schema del percorso del flusso, in grado di penetrare nella matrice porosa dello scaffold e passare dai lati esterni per evitare ristagni e eccessive turbolenze. (b) Schema della camera che alloggia lo scaffold e percorso del flusso attraverso la matrice porosa. (c) Rappresentazione del bioreattore completo con il circuito composto dalla pompa peristaltica, i reservoir e le camere di perfusione. (d) immagine delle 8 camere di coltura e reservoir inferiori.

Sui supporti sono state seminate cellule MC3T3-E1 con lo scopo di valutare la loro risposta al flusso, rispetto a quella di una coltura statica su Petri standard. È stato dimostrato che, dopo una prima fase di lieve diminuzione, fra i giorni 2 e 4, la quantità di cellule vitali a livello del core si è mantenuta, per il resto della coltura di 8 giorni, a circa l'80% rispetto a quella di semina. Nel caso statico, invece, il numero di cellule negli strati più interni è calato drasticamente fino alla quasi completa morte della coltura al giorno 8 (Figura 50A). Per compensare la possibile disparità di distribuzione delle cellule seminate è stato valutato anche il rapporto fra quantità di cellule nel core e nella periferia, confermando i risultati precedenti con un valore compreso fra 0,6 e 0,8 dal giorno 2 al giorno 8 (Figura 50B). Il

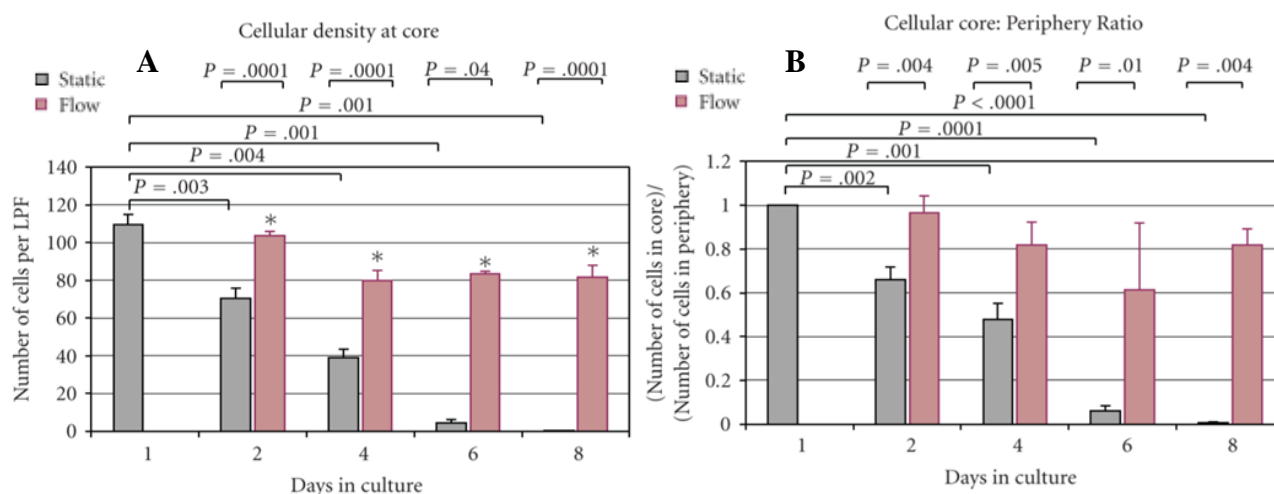


Figura 50 (A) Numero di cellule all'interno del core dello scaffold e (B) rapporto fra numero di cellule nel core e in periferia in giorni successivi, in condizioni statiche (grigio) e dinamiche (rosso).

semplice design di questo bioreattore potrebbe essere facilmente scalato per accomodare scaffold di dimensioni maggiori e fornire così, oltre a modelli di studio, anche apparati impiantabili *in vivo*. [111]

Uno studio successivo ha testato l'effetto di un flusso di 1ml/min di medium (0,1 dynes/cm²) attraverso uno scaffold in fibroina della seta (SF)/Gelatina (G)/idrossiapatite (HA) (Figura 51A). Le cellule MC3T3-E1 sono, inizialmente, state sospese nel terreno di coltura, all'interno del reservoir e seminate nello scaffold attraverso l'attivazione del flusso di medium stesso (protratto per 6 ore). Questo metodo ha permesso di ottenere una più uniforme distribuzione delle cellule all'interno della struttura porosa, rispetto a metodi di centrifugazione e agitazione. Con la successiva perfusione (della durata di 14 giorni) le MC3T3-E1, hanno dimostrato una risposta alla coltura di tipo dinamico che ha compreso una proliferazione maggiore (Figura 51B), un'attivazione aumentata della fosfatasi alcalina (ALP) e una più sostenuta deposizione di calcio, rispetto al controllo statico. Inoltre, in tutte le sezioni in cui è stato suddiviso lo scaffold, il doubling time della comunità cellulare è diminuito fino a più della metà (Tabella 3). Tale effetto è maggiormente evidenziato nella zona centrale.

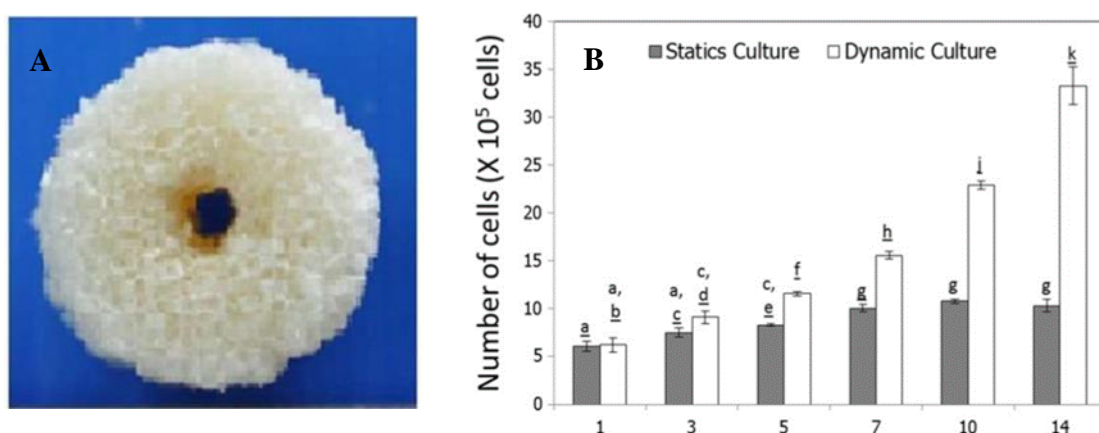


Figura 51 (A) fotografia dello scaffold in SF/G/HA. (B) Numero di cellule sullo scaffold in giorni successivi (da 1 a 14) nel caso statico (grigio) e dinamico (bianco).

Successivamente, sullo stesso scaffold, sono state testate cellule primarie rMSC (rat bone-marrow derived stromal cells) isolate da diafisi di femore di ratto, sottoponendole ad un flusso di 1, 3 o 5 ml/min, per valutarne la capacità di adesione a diverse portate. La portata maggiore (5 ml/min) ha causato un distacco cellulare di entità statisticamente rilevante confronto alle altre due velocità (Figura 52). La perfusione di 3 ml/min, invece, si è rivelata quella più vantaggiosa, riuscendo a sollecitare efficacemente le cellule, provocandone la proliferazione e, allo stesso tempo, preservando adeguatamente l'integrità delle proteine di adesione ancorate allo scaffold. [112]

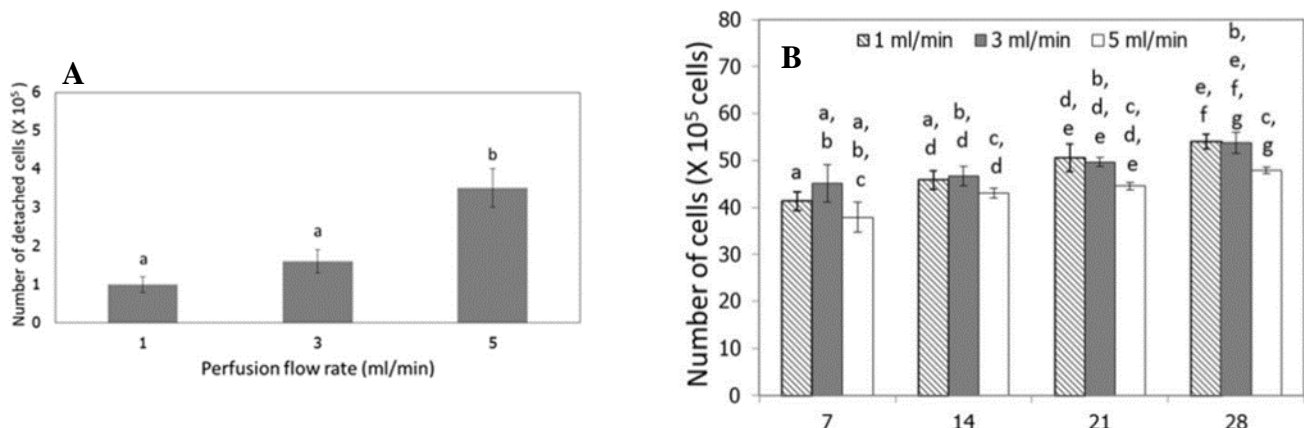


Figura 52 (A) numero di cellule distaccate a diversi livelli di portata a all'Inlet del sistema. (B) Numero di cellule rMSC ancorate allo scaffold in corrispondenza delle tre velocità di perfusione nei giorni 7, 14, 21 e 28 della coltura.

Tabella 3: Velocità di crescita e doubling time delle cellule seminate sullo scaffold nelle diverse sezioni da A (quella superiore, esposta direttamente al flusso) a D (inferiore).

Section	Section location	Specific growth rate (h ⁻¹)		Population doubling time (days)	
		Static culture ^a	Dynamic culture ^b	Static culture	Dynamic culture
	Whole scaffold	3.56×10^{-3}	5.40×10^{-3}	8.2	5.4
A	0-2.5 mm from top	2.60×10^{-3}	5.28×10^{-3}	11.2	5.5
B	2.5-5 mm from top	2.98×10^{-3}	5.78×10^{-3}	9.8	5.0
C	5.0-7.5 mm from top	4.14×10^{-3}	5.20×10^{-3}	7.0	5.6
D	7.5-10 mm from top	4.73×10^{-3}	5.36×10^{-3}	6.2	5.4

Un recente studio si è occupato dell'analisi approfondita della distribuzione del flusso, della concentrazione di ossigeno e della densità cellulare su uno scaffold fibroso (in policaprolattone) stampato in 3D, comparando diverse portate di fluido generate a livello dell'inlet del bioreattore. In questo caso sono state largamente sfruttate simulazioni numeriche per determinare le caratteristiche che il flusso assumeva penetrando all'interno delle fibre stesse della struttura porosa, con inlet di 0,02 0,1 e 0,5 ml/min per 5 giorni (Figura 53A). I risultati computazionali, poi validati sperimentalmente, hanno evidenziato come le diverse portate in ingresso abbiano prodotto sostanziali differenze nella velocità del flusso e nello stress di taglio esercitato su fibre e pareti del bioreattore, ma non abbiano intaccato la pressione, la densità cellulare media e la concentrazione di ossigeno (Figura 53B), la quale si rivela di centrale importanza nella coltura di cellule osteogeniche.

Si è poi passati alla stimolazione di cellule MC3T3-E1, disposte in un monolayer, con due diversi flussi pulsatili, misurando il rilascio di NO (molecola di segnale necessaria per l'avvio del processo di differenziamento cellulare), il numero delle cellule e il consumo di ossigeno (indice dell'attività metabolica). Il trattamento ha avuto la durata di 1 ora e i risultati sono stati comparati con un controllo statico. Il flusso pulsatile di intensità maggiore (ampiezza: 1 Pa, rateo del flusso: 27,8

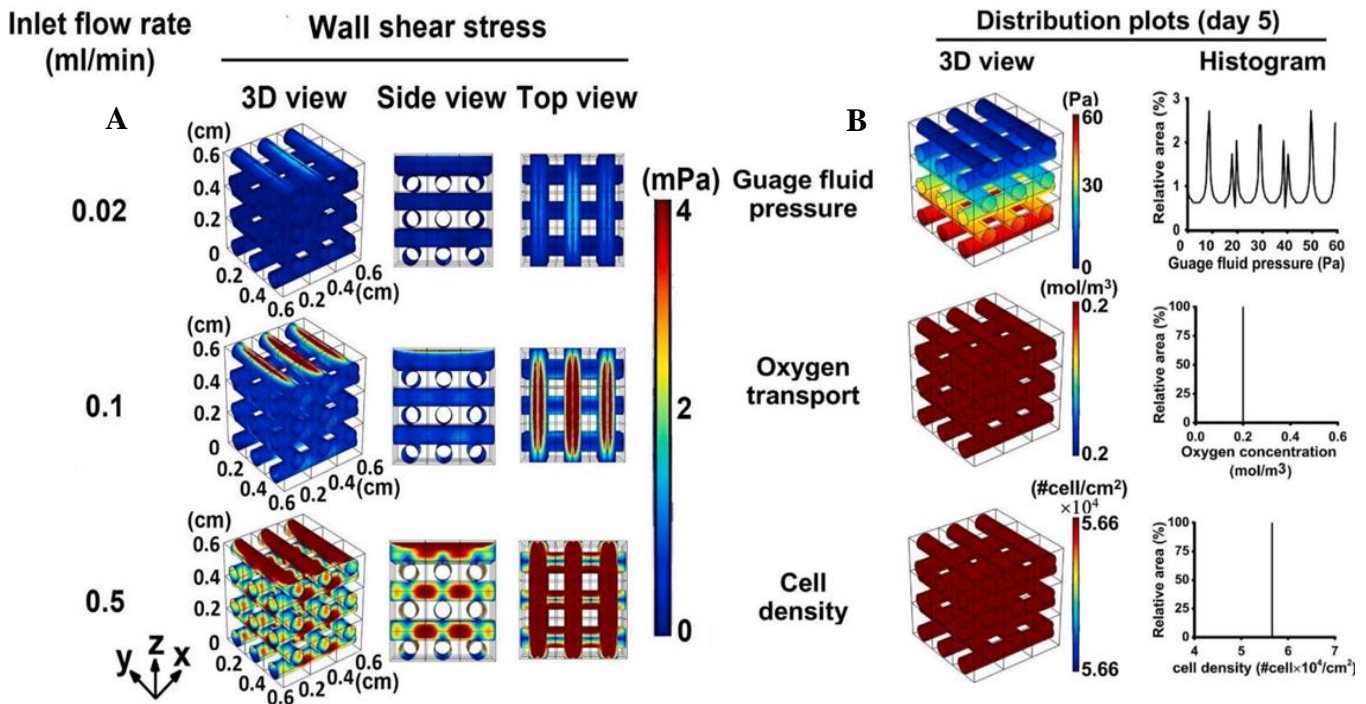


Figura 53 (A) Valutazione computazionale dello shear stress sulle fibre dello scaffold con portate di 0,5 0,1 e 0,02 ml/min. All'aumentare della portata del flusso si hanno shear stress maggiori sulle fibre, che diminuiscono progressivamente dalla parte superiore (sottoposta direttamente al flusso) a quella inferiore (B) Valutazione al giorno 5 di perfusione della pressione del fluido, del trasporto di ossigeno e della densità cellulare. La pressione aumenta in modo uniforme verso la parte inferiore dello scaffold, mentre trasporto di ossigeno e densità cellulare rimangono omogenei

ml/min, frequenza: 1Hz), dopo soli 10 minuti ha provocato un rilascio di NO maggiore di un fattore 72, rispetto al controllo, mentre tale valore è sceso a 22 e 13, rispettivamente a 30 e 60 minuti. Il flusso a bassa intensità (ampiezza: 0,126 Pa, rateo del flusso 3,5 ml/min, frequenza: 1 Hz), non ha causato un incremento dei livelli di NO in corrispondenza del primo time-point di 10 minuti, ma dopo 30 e 60 minuti il rilascio di NO si è rivelato, rispettivamente, di 10 e 8 volte maggiore rispetto allo statico.

Ciò dimostra come un flusso pulsatile ad alta intensità sia in grado di stimolare il differenziamento cellulare più efficacemente rispetto ad uno minore il quale risulta, a sua volta, più vantaggioso rispetto alla coltura statica. [113]

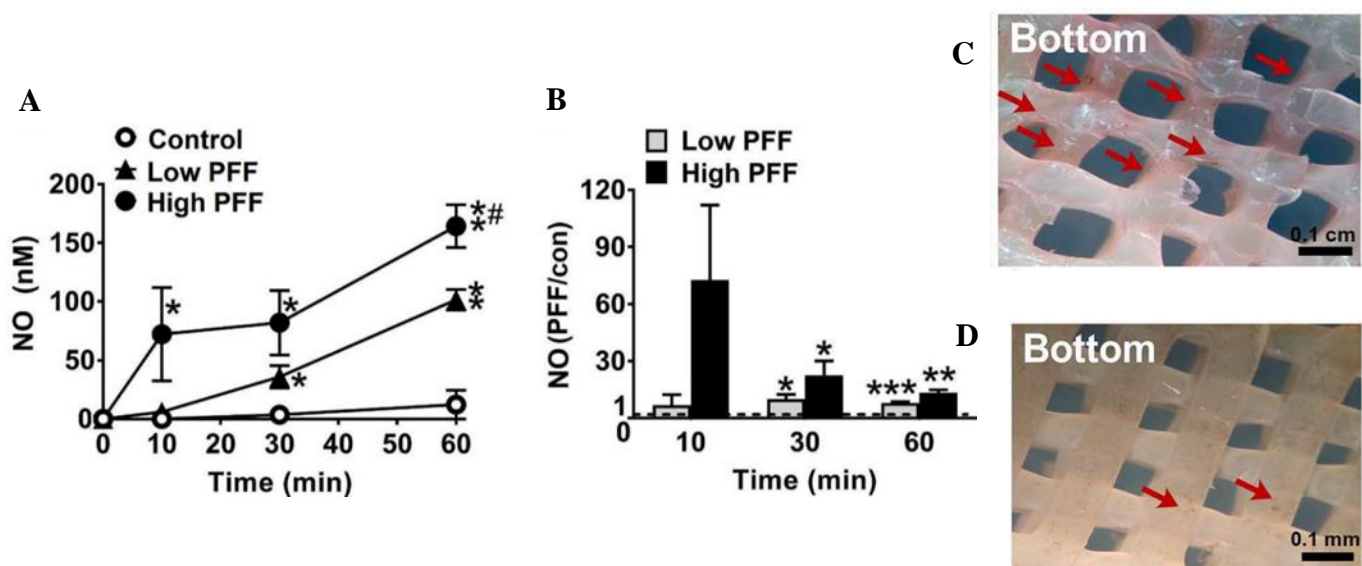


Figura 54 (A) Livelli di NO a diversi istanti nel corso di 1 ora di perfusione. (B) Livelli di NO normalizzati rispetto alla condizione statica, nel caso di perfusione a intensità più bassa (grigio) e più alta (nero). Proliferazione dei preosteoblasti e deposizione della matrice collagenosa, dopo 5 giorni, nella sezione inferiore dello scaffold (C) nel caso di regime perfusivo e (D) nel caso statico. Le frecce rosse indicano i punti in cui è visibile la ECM ed evidenziano un maggior rilascio di collagene (e una sua più omogenea distribuzione) nel caso dinamico.

Come detto, gli osteociti non esprimono una funzione diretta di riassorbimento o formazione del tessuto osseo. Questa evidenza ha spinto a formulare l'ipotesi, ormai comunemente accettata, che sortiscano un'attività regolatrice su osteoblasti e osteoclasti. Il preciso metodo di segnalazione che intercorre a livello molecolare fra i diversi gruppi cellulari non è ancora totalmente compreso, ma in diversi studi è stata indagata l'influenza del contatto fisico diretto fra osteociti e osteoblasti.

Gli osteociti sono provvisti di prolungamenti dendritici in grado di raggiungere le altre cellule ossee, compresi altri osteociti all'interno delle lacune vicine e formare con esse delle gap junction. Tali connessioni intercellulari, contribuiscono, assieme ai segnali paracrini rilasciati dagli osteociti, al processo di mecano-trasduzione ossea. Per analizzare questo meccanismo è stato ideato un metodo di coltura che ha previsto l'utilizzo di un inserto standard provvisto di una membrana perforata (pori del diametro di 1 μm) per la co-coltura *in vitro* di cellule osteocitiche (MLO-Y4) sul lato apicale e osteoblastiche (hFOB.19 e MC3T3-E1) su quello basolaterale (Figura 55A). Una ulteriore particolarità di questo lavoro è dovuta all'utilizzo di un disco rotante per la generazione di un flusso laminare non omogeneo sul lato apicale. Lo shear stress, infatti, andava da 0 dyne/cm^2 al centro del monolayer di cellule osteocitiche, fino a 4,4 dyne/cm^2 alla periferia, fornendo uno stimolo meccanico più fisiologico.

La co-coltura è stata impostata con due set-up diversi: adiacente e remota (Figura 55B). Nel primo caso osteociti e osteoblasti sono stati fatti aderire ai lati della membrana (con un gap di 10-20

μm) ed è stato osservato come le gap junction fossero in grado di formarsi all'interno dei pori e di mettere in comunicazione le cellule. Nella coltura remota gli osteoblasti erano, invece, fatti aderire sul fondo della camera basolaterale (con una distanza dagli osteociti di $900\ \mu\text{m}$).

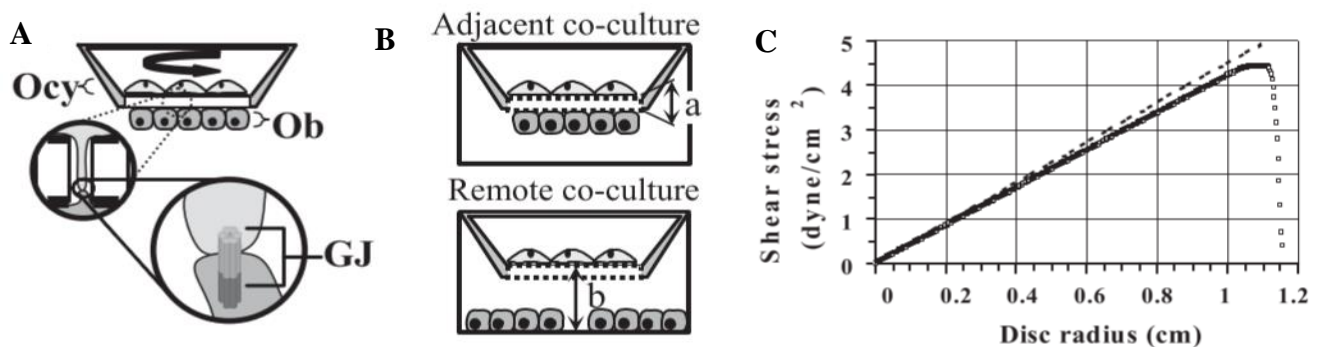


Figura 55 (A) Formazione del Gap Junctions (GJ) fra osteociti (Ocy) e osteoblasti (Ob) attraverso le porosità della membrana. (B) Modalità di co-coltura adiacente e remota. (C) Aumento quasi lineare dello shear stress teorico (-) e fornito dal modello computazionale (\square) indotto da una rotazione del disco a 225 rpm in funzione del raggio della membrana.

La stimolazione diretta degli osteoblasti *in vitro*, secondo la documentazione reperibile in letteratura ha fornito risultati spesso discordanti, soprattutto riguardo al processo di differenziamento. In questo caso, sottoponendo gli osteoblasti (in monocoltura) allo shear stress del flusso diretto, non è stato osservato un aumento della fosfatasi alcalina (ALP). Lo stesso risultato (Figura 56B) è stato ottenuto con la co-coltura adiacente di diverse cellule osteoblastiche (hFOB.19, MC3T3-E1) o fibroblastiche (BJ-FIB). L'aumento di ALP da parte degli osteoblasti è stato, invece, registrato nel caso della co-coltura adiacente MLO-Y4/hFOB.19. Tale effetto è stato annullato nel caso della stessa co-coltura, ma performata in modalità remota (priva di connessione fisica fra le due famiglie cellulari). Come ulteriore prova del contatto fisico fornito dalle gap junction, alla co-coltura adiacente sono stati aggiunti αGA o U-0126 (inibitori della formazione e dell'attività delle gap junctions). Con entrambe le molecole l'effetto sulla ALP è stato annullato (Figura 56A). [114]

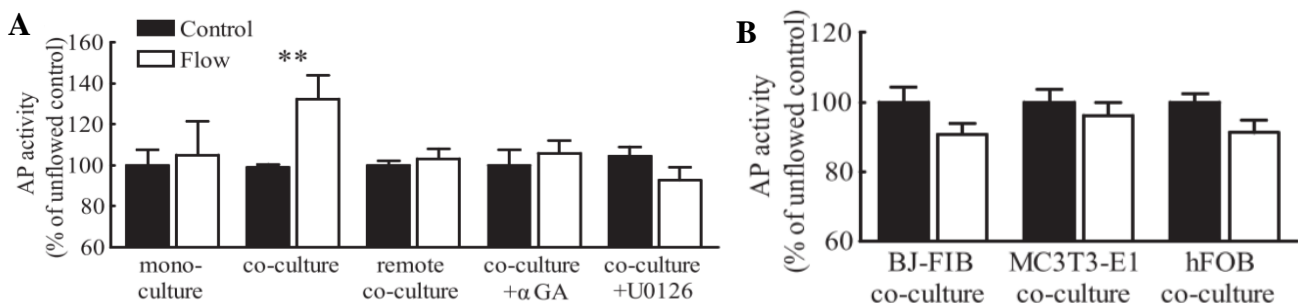


Figura 56 (A) confronto dell'attività della ALP nei diversi set-up di coltura fra MLO-Y4 e hFOB.19. (B) Livelli di ALP in co-culture adiacenti fra diverse cellule osteoblastiche e fibroblastiche.

4. Studio sperimentale

4.1 Introduzione

Nello studio proposto, l'obiettivo è quello di sviluppare un semplice bioreattore in grado di fornire, alle cellule in coltura, un flusso di medium controllabile attraverso un'interfaccia grafica, creata appositamente per modulare la velocità e la direzione della rotazione di due pompe peristaltiche indipendenti. Entrambe saranno in grado di effettuare la perfusione delle colture con 3 diverse portate dando, così, la possibilità di modulare lo sforzo di taglio impresso dal flusso sulla superficie delle cellule, oltre a permettere una movimentazione più o meno efficiente di nutrienti e scarti metabolici.

Le linee cellulari verranno seminate su due piastre 12-well stampate in 3D (3DP-12-well: 3D printed 12-well) appositamente per adattarsi al sistema di coltura proposto. Ognuno dei 3DP-12-well sarà collegato, attraverso due punti di connessione, ad una delle pompe, la quale provocherà il ricircolo costante del terreno di coltura attraverso i well, messi in collegamento fluidico fra loro tramite fori comunicanti.

Lo studio dei risultati verrà condotto attraverso l'osservazione qualitativa della morfologia delle cellule in corrispondenza di istanti temporali successivi. Ciò che si attende e che si vuole validare è l'ipotesi secondo la quale il flusso permetterà un miglioramento di proliferazione, e vitalità cellulare, rispetto alle colture statiche, oltre a provocare un effetto morfologico sui monolayer.

La possibilità di portare le linee cellulari più sfruttate nel campo della ricerca, ad uno stato di confluenza ottimale in un tempo minore rispetto a quello comunemente indicato, rappresenterebbe un'importante miglioria, grazie all'ottimizzazione delle tempistiche e dello sfruttamento di materie prime, come terreno di coltura e antibiotici. Inoltre, avendo a disposizione due piastre 3DP-12-well in grado di fornire risultati in parallelo e in modo indipendente, il throughput offerto da un bioreattore di questo tipo rappresenterebbe un vantaggio considerevole rispetto a dispositivi fluidici provvisti di una singola camera o che prevedono l'utilizzo di una sola piastra.

Con l'obiettivo di fornire un termine di comparazione sugli effetti di una coltura dinamica sullo sviluppo di due apparati fisiologici (intestinale e osseo) dalle caratteristiche anatomiche e funzionali molto differenti fra loro, sono state selezionate per lo studio le linee cellulari Caco-2 e MC3T3-E1. *In vivo*, entrambe le famiglie cellulari nelle quali esse sono in grado di differenziarsi, sono sottoposte rispettivamente al flusso del lume intestinale e a quello del fluido interstiziale, messo in movimento da diversi fattori meccanici all'interno delle porosità ossee. Una coltura dinamica si suppone, perciò, maggiormente adeguata alla riproduzione *in vitro* di un ambiente simile a quello nativo delle cellule.

4.2 Materiali e metodi

4.2.1 Bioreattore

Il bioreattore (Figura 57), assemblato con lo scopo di generare il flusso per la perfusione cellulare, si compone di: unità pompe e unità di controllo.

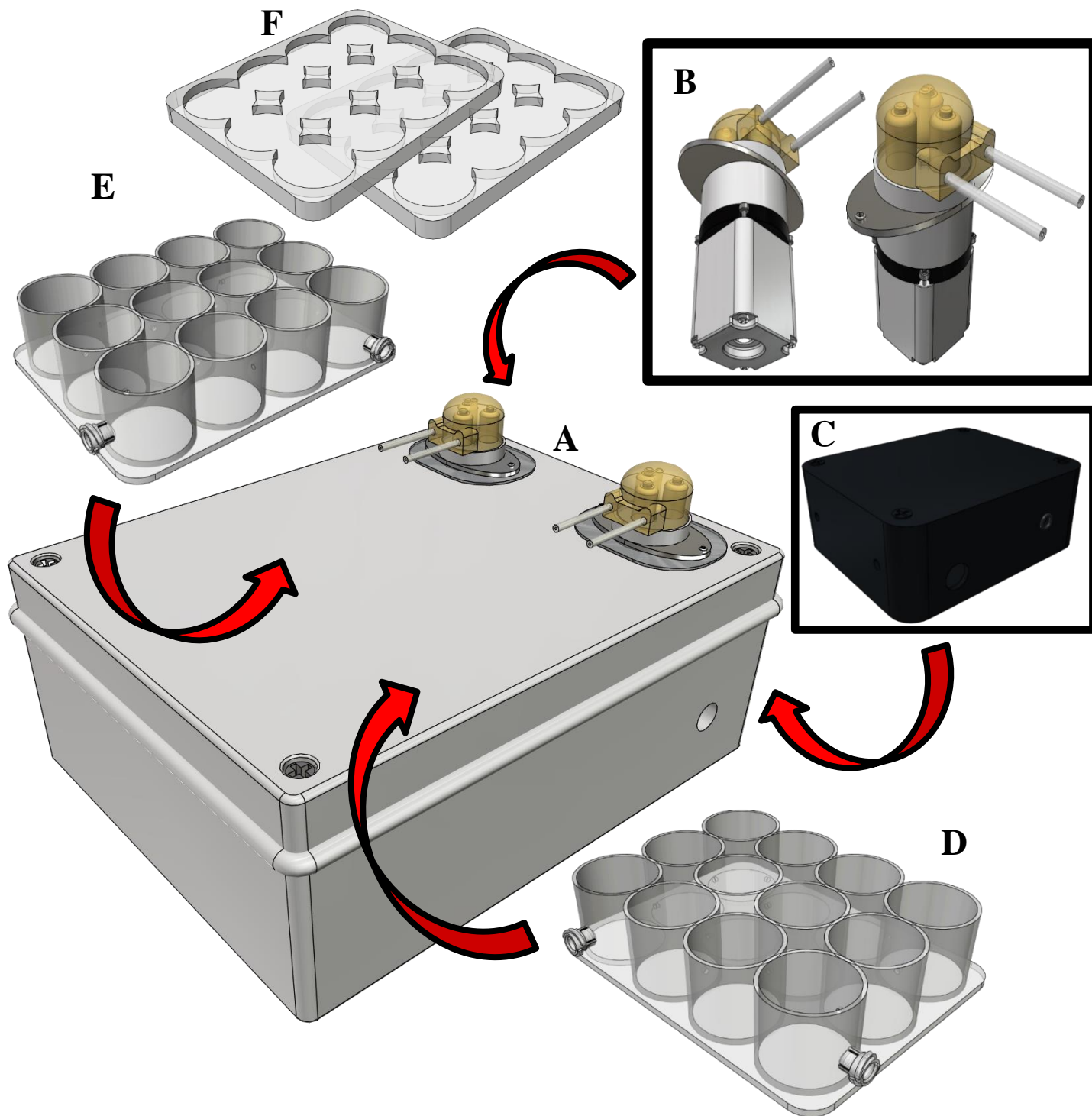


Figura 57 CAD dei diversi componenti del bioreattore: (A) unità pompe, (B) pompe, (C) unità controllore, piastre 12-well (D) destra e (E) sinistra e (F) coperchi per le piastre 12-well.

L'unità pompe si compone di un case in materiale plastico (240x190x95mm) nel quale sono alloggiato le due pompe WELCO WPM2-S1-EA-CP (Figura 61A). La sigla indica le caratteristiche delle pompe stesse, in particolare:

- Ⓜ WPM2: la pompa è sterilizzabile attraverso il metodo dell'autoclave ed è in grado di sopportare il flusso di liquidi fino ad 80°C.
- Ⓜ S1: la tubazione è costituita di silicone, con un diametro esterno di 3mm interno di 1 mm.
- Ⓜ EA: la pompa peristaltica, per la generazione del flusso si serve di un motore passo-passo bipolare (4-wires) in grado di ruotare ad una velocità variabile fra 1 e 150 rpm.
- Ⓜ C: la cassette della pompa è trasparente (clear).
- Ⓜ P: la pompa peristaltica è compresa di supporto metallico (bracket), per il fissaggio al case.

[115]

Per la stampa 3D delle piastre 3DP-12-well la stampante Form 3B di formlabs (Figura 58A). Questo modello, che sfrutta la tecnologia della SLA (stereolitografia), è particolarmente indicato per la realizzazione di componenti ad uso biomedicale. La stereolitografia prevede l'utilizzo di particolari resine fotosensibili che vengono indurite tramite l'utilizzo di una sorgente al laser. Grazie a questo tipo di tecnologia è possibile raggiungere una risoluzione sul piano XY particolarmente elevata e, in particolare, quella della stampante Form 3B si attesta a 25 µm, mentre lo spessore dei layer sull'asse Z può andare da 25 a 300 µm.

Come materiale di costruzione è stata impiegata la resina BioMed Clear, prodotta dalla stessa azienda. La trasparenza degli oggetti stampati attraverso questa resina permette una visuale ottimale del loro contenuto: fattore essenziale per la realizzazione dei well. Inoltre, la resina, una volta polimerizzata durante il processo di stampa, raggiunge una rigidità e una resistenza all'usura ottimali, oltre ad offrire un basso tasso di assorbimento di fluidi nel tempo. Queste caratteristiche, assieme alla sua biocompatibilità, comprovata anche nel lungo periodo, la rendono ideale per impieghi che necessitano di contatto prolungato con la pelle, le mucose biologiche o, come in questo caso, con una coltura cellulare.

Le stampe sono state effettuate tramite il software PreForm, fornito dall'azienda formlabs stessa procedendo, poi, alla finitura dei pezzi, lavandoli con un primo passaggio in acqua e sapone e, successivamente, in alcol isopropilico, per la rimozione dei residui superficiali di resina non polimerizzata. Infine, si è proceduto al completo indurimento dei pezzi tramite la sottoposizione degli stessi a un periodo di riscaldamento di 60 minuti a 60°C, a cui è associata una irradiazione con luce UV. Lo strumento utilizzato a tale scopo è il denominato Form Cure (Figura 58C) e permette di

ottenere la polimerizzazione ottimale della resina, conferendole le proprietà meccaniche finali. [116]
[117]

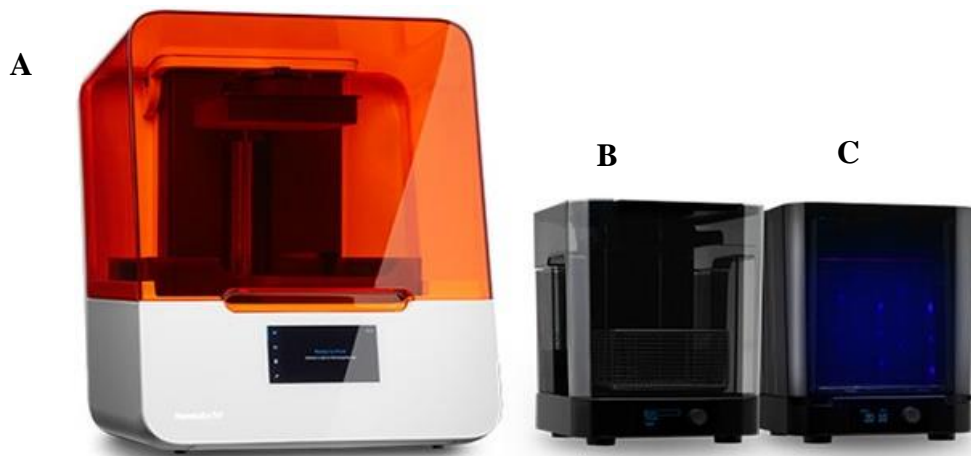


Figura 58 (A) Stampante Form 3B di FormLabs e strumenti per il posto processing dei pezzi stampati in 3D con un passaggio di lavaggio in alcol nel dispositivo (B) FormWash e successiva polimerizzazione con luce UV e calore nel (C) FormCure.

Prima di effettuare la stampa dei 3DP-12-well sono stati realizzati, con l'utilizzo del software 123D CAD, tre singoli well, delle stesse dimensioni di quelli che verranno incorporati nel 3DP-12-well, ognuno dei quali presentava una coppia di LuerLock (connettori per il sistema fluidico), di differente diametro interno (Figura 59). In particolare, quello più ampio presentava un diametro di 4,1 mm mentre, negli altri, tale misura è stata diminuita, rispettivamente di 50 μm (Ø 4,05 mm) e di 100 μm (Ø 4 mm). Per differenziare i tre well sono state aggiunte delle piccole indentazioni nella parte superiore di ognuno: una tacca per quello con diametro maggiore, due per la misura media e tre per quella minore. Tale stadio preliminare di test è stato studiato per selezionare la dimensione ottimale dei Luer Locks, in modo da minimizzare il rischio di perdite o incompatibilità nella connessione delle tubazioni nel design finale. Dopo una serie di prove è stato selezionato il well con diametro interno dei connettori di 4,1 mm.

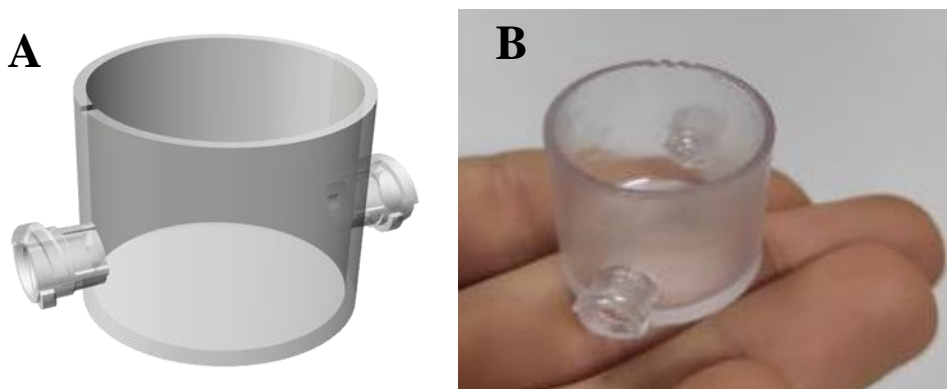


Figura 59 (A) CAD e (B) fotografia del singolo well di test

Le piastre le piastre 3DP-12-well sono state progettate sfruttando nuovamente il software 123D CAD. Esse presentano due connettori per l'entrata e l'uscita del terreno di coltura e i vari well sono messi in comunicazione da fori di 1,6 mm di diametro (a parte quelli di entrata e uscita, che presentano un diametro pari a quello interno dei Luer Locks selezionati), posizionati ad una altezza di circa 6 mm dal fondo dei pozzetti. Le due versioni sviluppate dei 3DP-12-well mostrano una architettura del tutto simile fra loro, tranne che per la direzione di uno dei connettori, posizionato dal lato opposto, in maniera speculare, per meglio accomodare la posizione delle pompe.

Per la completezza dello studio sono state stampate 2 piastre 3DP-12-well con connettore sul lato destro e due sul lato sinistro, in modo da sfruttare due di queste connettendole al bioreattore per sottoporre la coltura al flusso, mentre le altre due serviranno come controllo statico, per valutare la vitalità e l'attività cellulare nei due metodi.

Il pattern del flusso del terreno di coltura attraverserà tutti i pozzetti in successione, come mostrato in Figura 60.

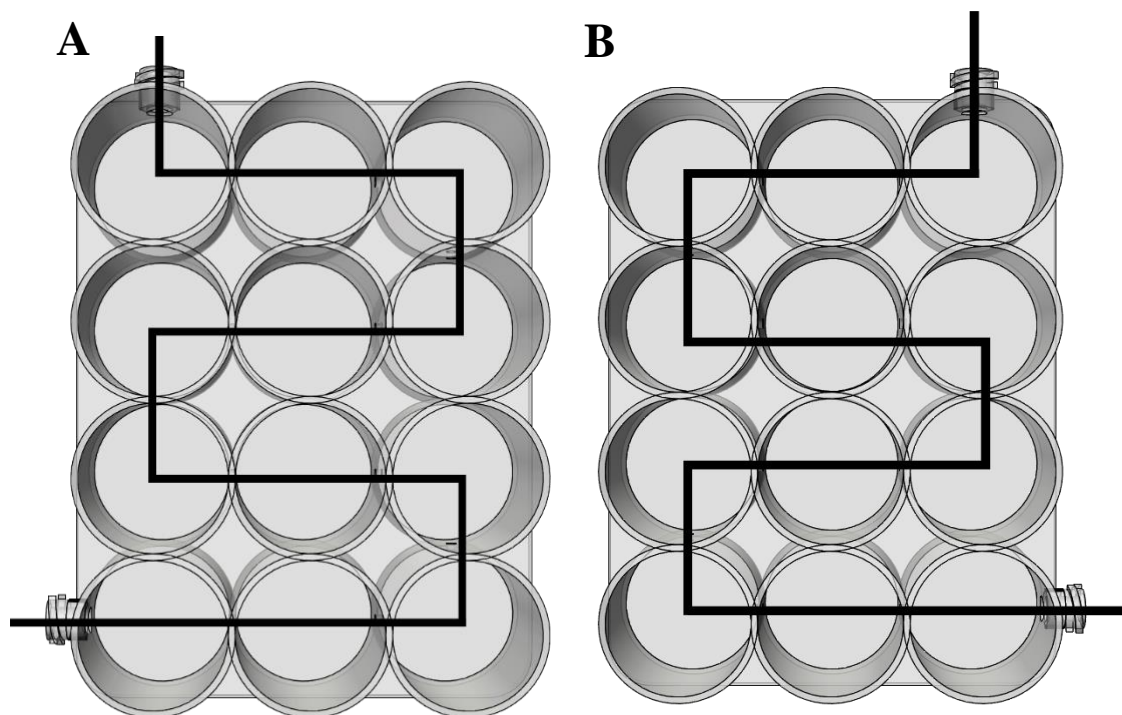


Figura 60 Schema del percorso fluidico del media all'interno delle piastre (A) sinistra e (B) destra.

Infine, si è proceduto alla stampa, dei quattro coperchi da applicare alle piastre 3DP-12-well per evitare che l'ambiente esterno possa intaccare la coltura, assicurandosi, tuttavia, che i coperchi lascino una certa possibilità di penetrazione d'aria nei pozzetti.

Il circuito fluidico che conetterà le pompe ai 3DP-12-well è stato assemblato utilizzando tubazioni Tygon S3 dal diametro interno di 1/16 di pollice (1,5875mm), esterno di 1/8 inch (3,175mm) e spessore di 1/32 inch (0,79375 mm), facendo attenzione a mantenere i due sentieri di ricircolo, della

stessa lunghezza, per far sì che all'interno fluisca lo stesso volume di terreno di coltura. Per lasciare la possibilità di separare i circuiti fluidici dai 3DP-12-well in sicurezza, dopo aver arrestato le pompe, sono stati utilizzati dei connettori Spiros®/MicroClave®, particolarmente sfruttati in ambito medico/oncologico. Ciò rende più agevoli l'ispezione in microscopia e la manipolazione sotto cappa del contenuto cellulare delle piastre.

L'unità di controllo alloggia, all'interno di un case in alluminio (145,21x121,21x56,39 mm), una scheda Arduino Uno (Figura 61B) affiancata da due driver (A3967 Microstepping Driver - Sparkfun), (Figura 61C) per il controllo delle pompe peristaltiche e da un alimentatore a 12V, secondo lo schema elettrico descritto in Figura 62.

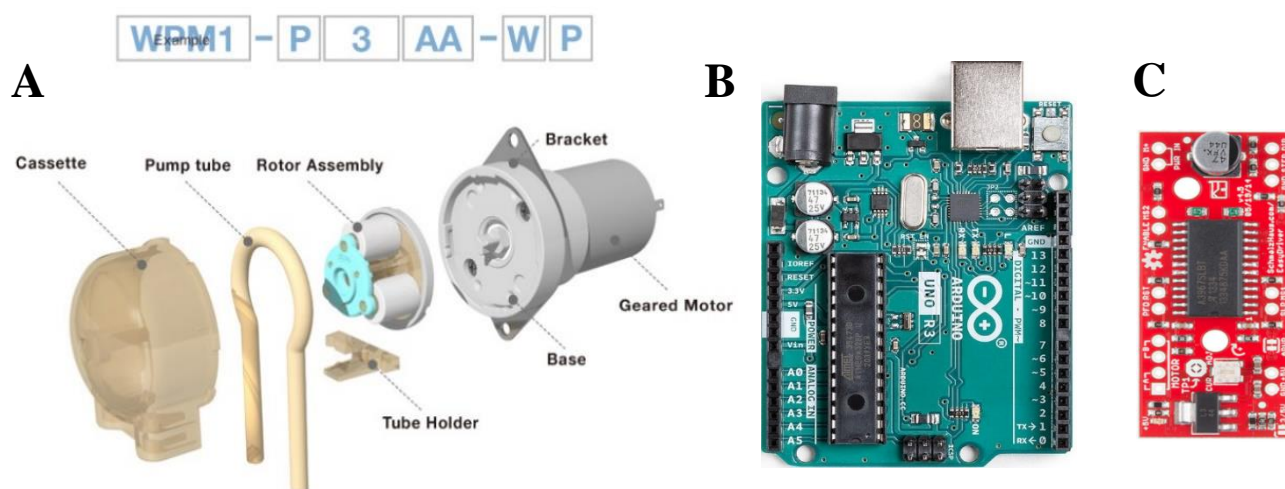


Figura 61 (A) Schema dei diversi componenti della pompa peristaltica utilizzata. (B) Microcontrollore Arduino Uno. (C) Driver per motori passo-passo EasyDriver A3967. L'unità di controllo comprende due di tali driver per il controllo indipendente delle due pompe.

La scheda Arduino è stata programmata attraverso il software apposito (Arduino IDE), per fornire in uscita i segnali digitali necessari per azionare la rotazione e definirne il verso. In entrata vengono, simultaneamente, acquisiti i segnali provenienti dal canale seriale con cui il software Processing e la relativa interfaccia grafica permettono di controllare il sistema.

I due driver, ognuno dei quali è responsabile del controllo di uno dei motori passo-passo, sono stati utilizzati per ottenere una maggiore precisione nella rotazione delle pompe oltre a fornire indipendenza dei movimenti delle stesse.

Il funzionamento dei driver permette il movimento di un passo di rotazione dei motori ogni volta che il segnale fornito al pin STEP (presente sulle schede driver) passerà da basso ad alto tramite il segnale inviato dal controllore Arduino, mentre il pin DIR permetterà di invertire il verso di rotazione. In base al setting dei pin MS1 uno e MS2, presenti sui driver, è possibile selezionare la suddivisione del passo desiderata. Nel nostro caso non sono stati collegati perciò, di default, sono settati entrambi a 1. Ciò permette di suddividere ogni passo del motore in 8. Essendo la rotazione completa di uno stepper standard suddivisa nativamente in 200 passi ($1,8^\circ$ ognuno), per ottenere la stessa rotazione di 360° con i driver saranno necessari 1600 passi ($0,225^\circ$ ad ogni passo). [118]

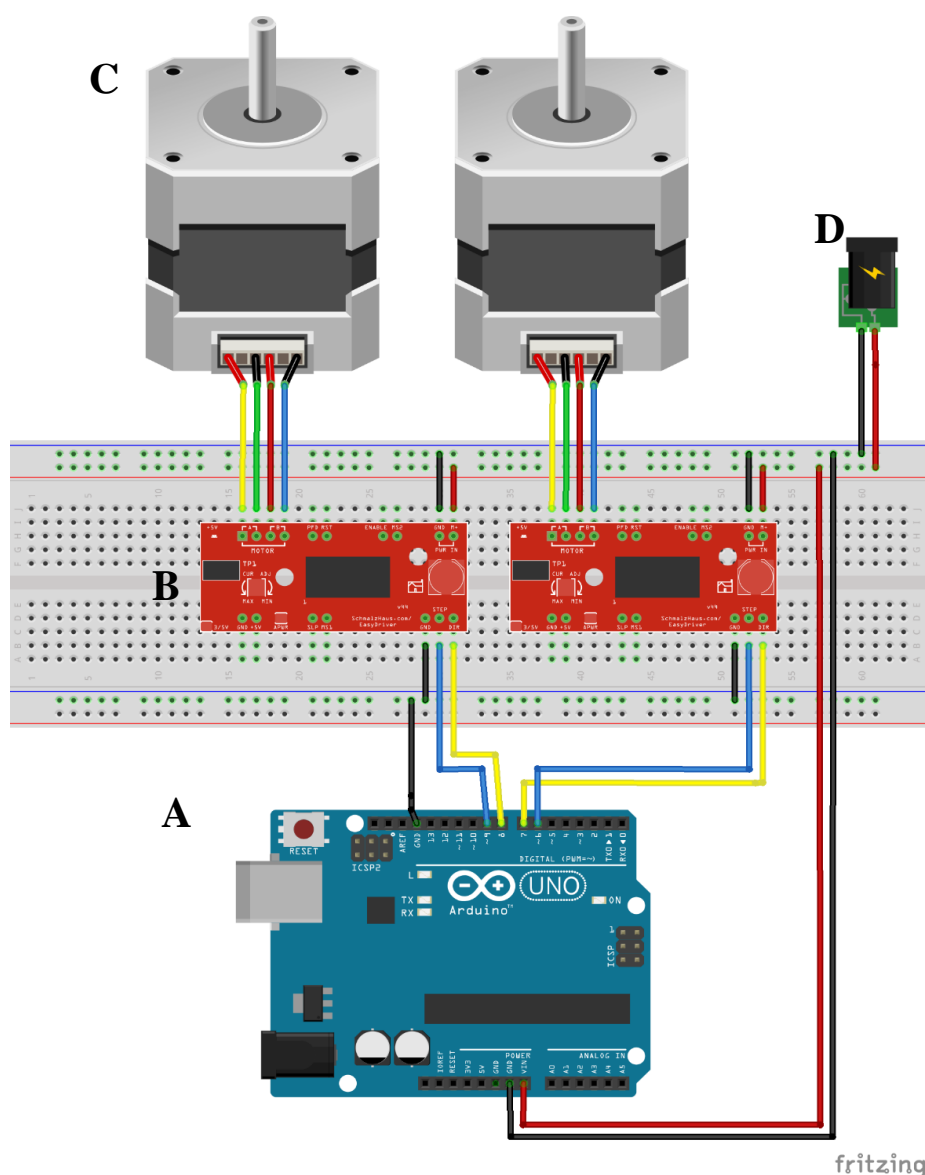


Figura 62 Schema elettrico delle connessioni fra il controllore (A) Arduino Uno, (B) i driver, (C) i motori stepper delle pompe e (D) l'alimentatore.

4.2.2 Interfaccia grafica

La costruzione del bioreattore è stata progettata prendendo ad esempio lo strumento utilizzato in un precedente studio, attraverso il quale è stato analizzato il comportamento di cellule osteogeniche L88/5. In quel caso il flusso imposto dal bioreattore ha fornito un ambiente ideale per una più rapida crescita e differenziamento cellulare verso il fenotipo atteso: effetti imputabili alle forze di taglio impresse e al rapido turnover dei nutrienti; diminuendo, inoltre, la necessità di aggiungere al terreno di coltura fattori di crescita e citochine. [119] [120]

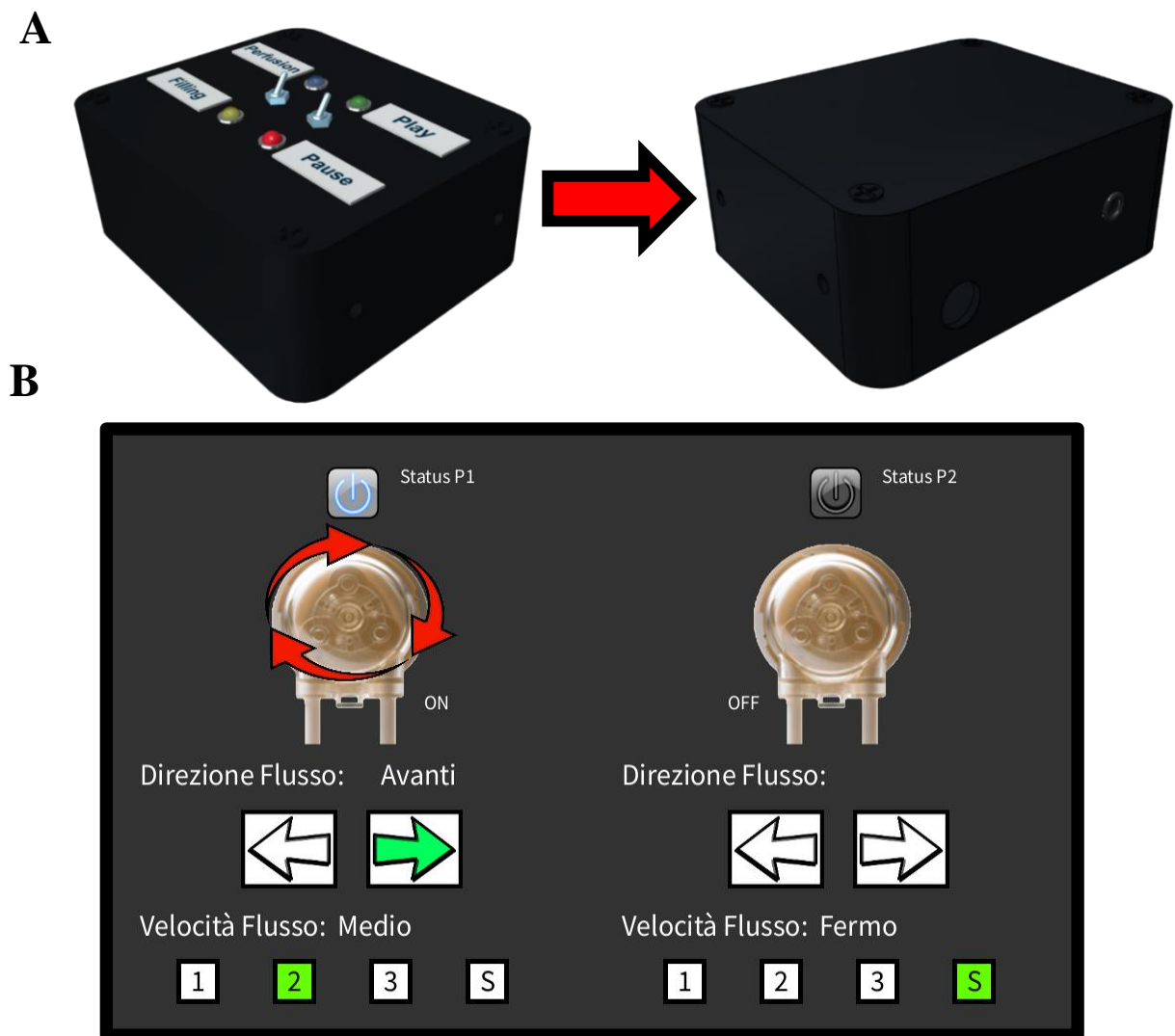


Figura 63 (A) Modello CAD dell'unità controllore del precedente bioreattore con switch fisici e nuova unità controllore comandata attraverso (B) l'interfaccia grafica sviluppata con Processing. Nell'immagine riportata la pompa 1 è in funzione e ruota in senso orario a velocità media, mentre la pompa 2 è spenta.

In tale esperimento l'unità di controllo presentava sulla superficie superiore due switch fisici e quattro LED indicatori dello stato di azionamento del sistema (perfusione, riempimento, play e pausa), mentre nella versione attuale si è optato per sostituire l'interfaccia di comando fisica con una grafica

di tipo virtuale, programmata attraverso l'uso del software Processing (Figura 63). I controlli del sistema prevedono la possibilità di azionare le due pompe peristaltiche in modo del tutto indipendente fra loro e di variare la velocità di rotazione delle stesse (provocando, di conseguenza, una portata del flusso differente) o di bloccare la perfusione.

4.2.3 Linee cellulari

Sono state sfruttate due linee cellulari molto diverse fra loro per comparare i diversi effetti che una coltura di tipo dinamico può avere sullo sviluppo di determinati fenotipi. Una di esse è rappresentata dalla linea cellulare Caco-2 (passaggio 17), ampiamente descritta nei capitoli precedenti, mentre la seconda è quella delle cellule MC3T3-E1 (passaggio da 25 a 30).

I terreni di coltura utilizzati sono stati: α -MEM (Minimum Essential Medium - alpha modification) per le cellule MC3T3 e DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), con amminoacidi non essenziali. Entrambi i terreni di coltura contenevano FBS (10%), L-Glutammina (1%) e Penicillina/Streptomicina (1%). Durante i periodi di sperimentazione le cellule sono state mantenute, all'interno dell'incubatore, in condizioni ambientali controllate caratterizzate da 37°C, 5% CO₂.

4.2.4 Caratterizzazione del flusso

Attraverso la modulazione delle rotazioni per minuto delle pompe peristaltiche è stato possibile produrre un flusso di 0,2 ml/min alla velocità minore settabile attraverso l'interfaccia grafica, 0,5 ml/min nel caso intermedio, fino a circa 0,75 ml/min alla velocità massima di rotazione imponibile, pari a velocità a livello dell'imboccatura di ingresso e uscita (del diametro di 4,1 mm) rispettivamente di 0,93 mm/s, 0,46 mm/s e 0,5 mm/s. Tali valori si traducono in shear stress sul fondo dei pozzetti del valore, rispettivamente, di: 12,8 μ Pa, 6,5 μ Pa e 3,5 μ Pa. Il Flusso è stato supposto in regime laminare e non pulsatile a parte a livello delle bocchette di Inlet e Outlet delle piastre in corrispondenza delle quali, nei pozzetti di ingresso e uscita, proprio a causa delle possibili turbolenze che potrebbero svilupparsi, non verranno posizionate le cellule in coltura.

4.2.5 Microscopia

I risultati dello studio sono stati raccolti e analizzati attraverso l'osservazione qualitativa in microscopia ottica in campo chiaro delle cellule (ingrandimento 10x), poste in coltura su vetrini del diametro di 15mm e 12mm. A tale scopo è stato utilizzato un microscopio Nikon ECLIPSE Ti (Figura 64). Non è stata effettuata una conta cellulare e non è stata verificata quantitativamente la densità di semina cellulare, poiché l'esperimento non richiedeva un tale grado di precisione.

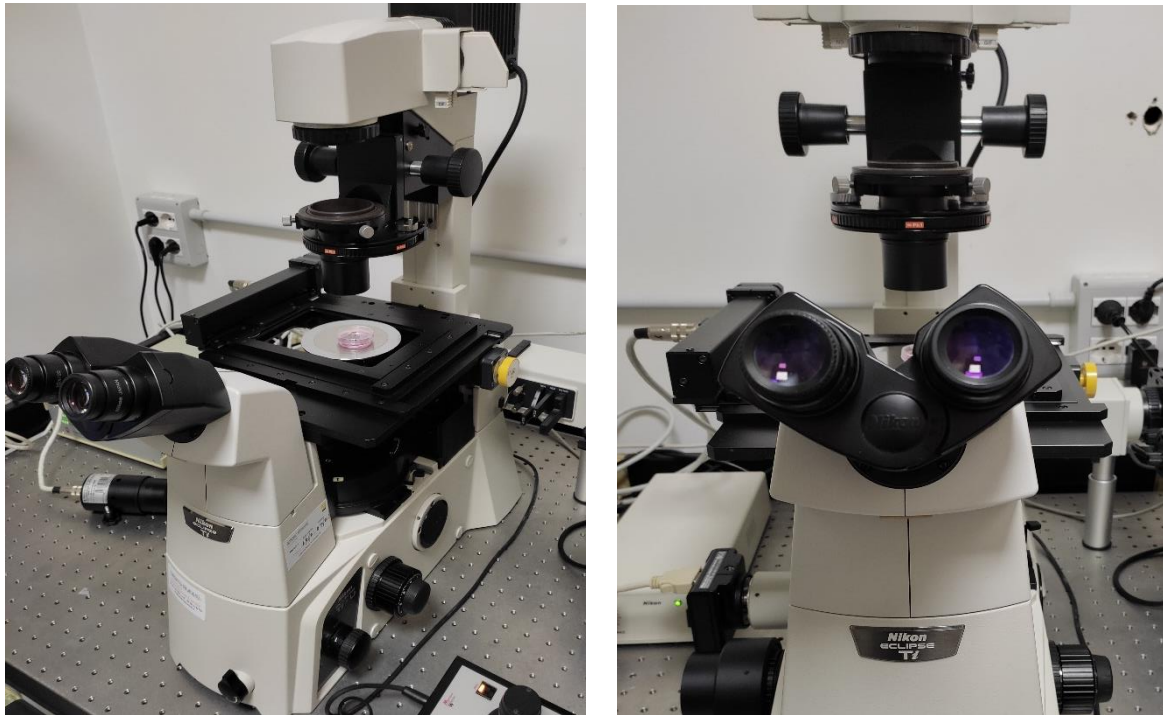


Figura 64 Microscopio utilizzato per la visualizzazione delle cellule in coltura

4.2.6 Studio della morfologia cellulare

Lo studio della morfologia cellulare è stato effettuato comparando il parametro di eccentricità delle cellule coltivate nelle condizioni statiche e dinamiche, attraverso il software Imagej. L'eccentricità è un dato numerico che va da 0 a 1 e indica il rapporto fra i semiassi maggiore e minore della cellula osservata tramite microscopia ed è calcolata attraverso la formula:

$$E = \sqrt{1 - \frac{b^2}{a^2}}$$

Dove E è l'eccentricità e a e b rappresentano rispettivamente i valori dei semiassi maggiore e minore della cellula. Un valore più prossimo all'unità dell'eccentricità indica una forma più allungata della cellula, mentre se E tende a 0 la morfologia assumerà un aspetto più tondeggiante. [121]

L'analisi ha previsto la misurazione manuale delle dimensioni di tali valori su campioni di 10 cellule per ognuna delle condizioni studiate (Figura 65).

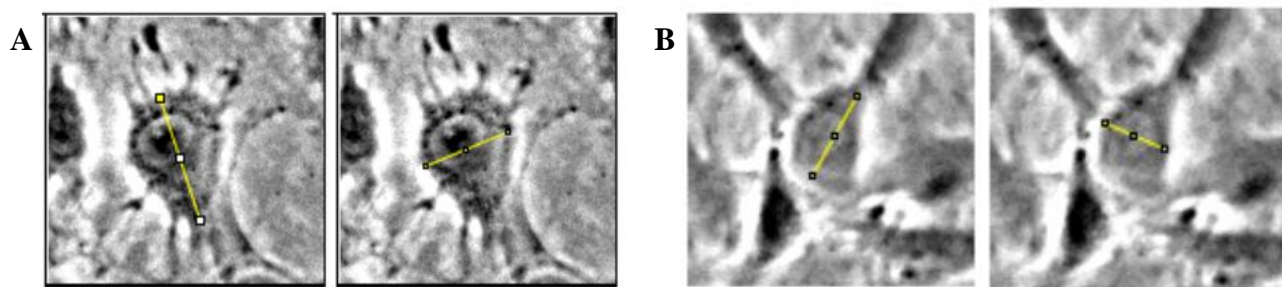


Figura 65 Misurazione degli assi maggiore e minore di due diverse cellule MC3T3 appartenenti ad (A) la coltura dinamica e (B) quella statica, dopo 72 ore.

4.3 Risultati e discussione

4.3.1 Test dei componenti

Dopo aver assemblato i circuiti fluidici (prima di avviare l'esperimento vero e proprio) si è proceduto a condurre una prova di tenuta, effettuata riempiendo i well con semplice acqua distillata, per assicurarsi che non ci fossero perdite a livello di uno qualsiasi dei punti di connessione dei circuiti fluidici.

Verificata l'integrità delle vie fluidiche, i circuiti sono stati disassemblati e i vari componenti, (connettori, tubazioni, piastre 3DP-12-well e i coperchi) sono stati sterilizzati in autoclave. Il processo ha previsto un aumento di temperatura fino a 120°C e un incremento di pressione fino a 1 bar, in un periodo di circa 20 minuti. Non è stato rivelato alcun tipo di danneggiamento dei componenti a causa



Figura 66 Fotografie del bioreattore con i circuiti fluidici completamente assemblati.

della procedura, a parte una lieve opacizzazione delle tubazioni e un leggero grado di rammollimento di alcuni pezzi stampati in 3D nei primi istanti dopo l'estrazione dall'autoclave. Con il raffreddamento i pezzi sono tornati alla normale consistenza e rigidità.

4.3.2 Studio MC3T3

4.3.2.1 Test di biocompatibilità

La prima fase dello studio si è rivolta alla valutazione della biocompatibilità dei 3DP-12-well. La presenza di eventuali residui monomerici dovuti ad una eventuale polimerizzazione solamente parziale della resina, infatti, potrebbe essere causa di effetti tossici sulle cellule.

Le cellule MC3T3-E1 al passaggio 25 sono state seminate su vetrini dal diametro di 12 mm ad una densità di 5000 cellule/cm². Dopodiché i vetrini sono stati trasferiti all'interno dei supporti di coltura. I diversi set-up sono riportati in Tabella 4.

Tabella 4: set-up di coltura delle cellule MC3T3-E1 per il test di biocompatibilità.

Tipo di coltura	Standard	Biomat	Static
Linea cellulare	MC3T3-E1 (25° passaggio)	MC3T3-E1 (25° passaggio)	MC3T3-E1 (25° passaggio)
Densità cellulare	5000 cellule/cm ²	5000 cellule/cm ²	5000 cellule/cm ²
Diametro vetrino	Ø12 mm	Ø12 mm	Ø12 mm
Supporto	Piastra 12-well standard (Polistirene)	3DP-12-well (BiomedClear)	3DP-12-well (BiomedClear)
Terreno di coltura (α -MEM) dispensato	1 ml per pozzetto	1 ml per pozzetto	40 ml totali

Le piastre sono, quindi, state trasferite all'interno dell'incubatore in condizioni di coltura standard: 37°C, 5% CO₂. I risultati sono stati raccolti attraverso microscopia ottica in campo chiaro dopo 24 e 72 ore (Figura 67).

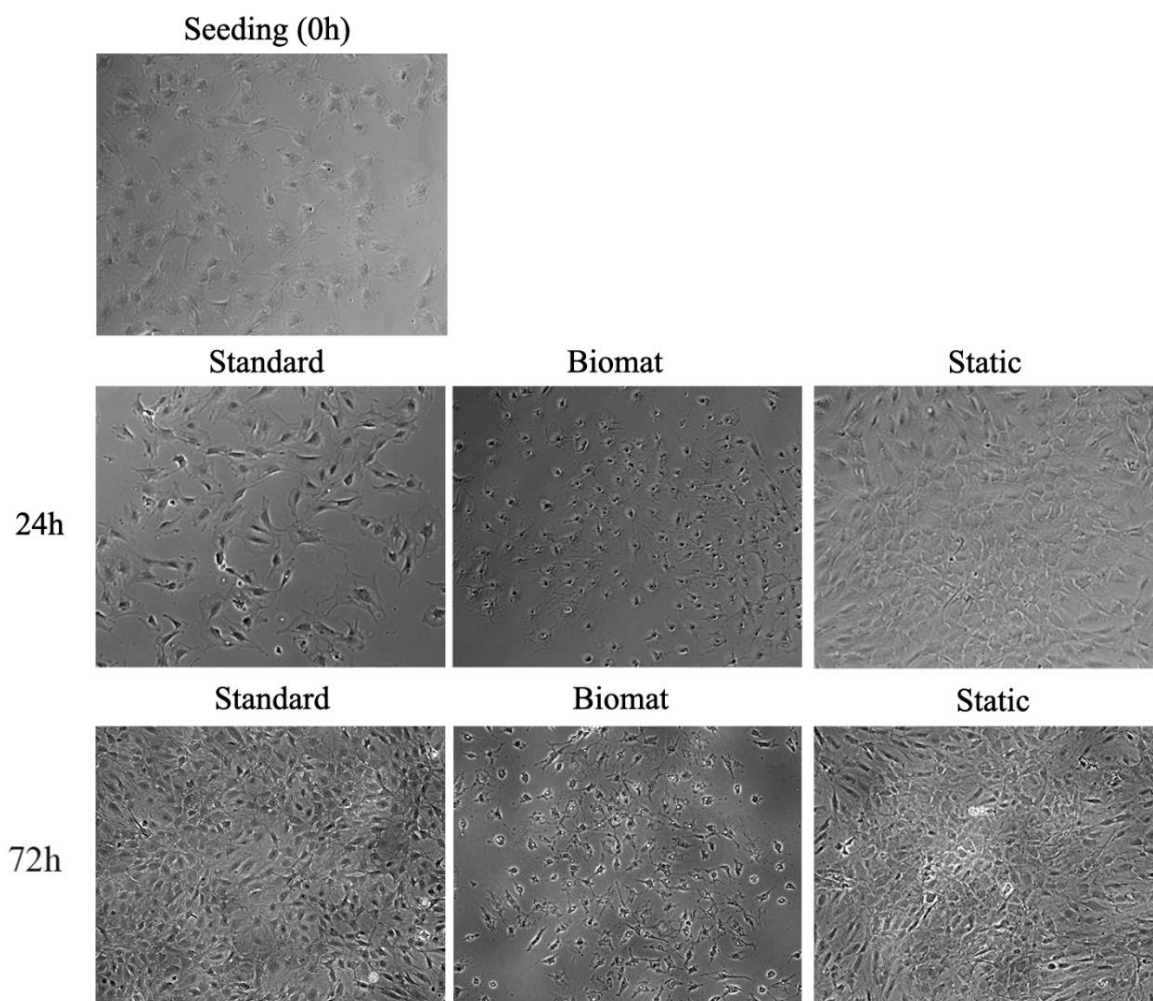


Figura 67 Fotografia ottenuta tramite microscopia in campo chiaro della coltura delle cellule M3T3, al momento della semina (0h), dopo 24 e 72 ore di coltura in condizioni statiche su piastra standard in polistirene (standard) con 1 ml di terreno di coltura in ogni pozzetto su 3DP-12-well nelle stesse condizioni (Biomat) e su 3DP-12-well con 40 ml di terreno di coltura (Static).

A 24 ore, comparando le colture “Standard” e quelle “Biomat” (entrambe con i pozzetti popolati forniti di 1 ml di terreno di coltura), si nota una buona capacità proliferativa delle cellule, nel primo caso. Il biomateriale, invece, sembra avere un effetto negativo sulla propagazione delle cellule MC3T3-E1, i cui corpi cellulari risultano più piccoli e con scarse estroflessioni. Nel caso della coltivazione “Static”, le cellule hanno dimostrato una capacità proliferativa maggiore andando a generare zone densamente popolate.

Dopo 72 ore, le cellule nella condizione “Standard” hanno continuato la loro fase di crescita ed espansione raggiungendo lo stato confluento, mentre quelle nella coltura “Biomat” hanno confermato una scarsa capacità proliferativa. Anche nel caso “Static” si osserva una continuità con i risultati a 24 ore, con la formazione di un monolayer compatto.

Questi risultati suggeriscono come il materiale sul quale sono posizionati i vetrini abbia, effettivamente, un'influenza sulle cellule in coltura. Tale effetto, potrebbe essere dovuto alla liberazione di composti monomerici da parte della resina BiomedClear in contatto con il terreno di coltura. Le conseguenze dell'utilizzo del biomateriale polimerico, tuttavia, sembrano essere annullate dalla somministrazione di una quantità di 40 ml di terreno di coltura: quantità in largo eccesso per il supporto delle funzioni metaboliche delle cellule presenti sui due vetrini. Può essere ipotizzabile che i presunti prodotti rilasciati dai 3DP-12-well non causino gravi danni cellulari se fortemente diluiti all'interno del terreno di coltura. Questo, infatti, anche in assenza di flusso, potrebbe avere una certa propensione a redistribuirsi fra i pozzetti interconnessi, seguendo gradienti diffusivi generati dal metabolismo cellulare stesso.

La conclusione che è possibile trarre, è che la resina con cui sono stati stampati i 3DP-12-well può avere un effetto negativo sulla proliferazione delle cellule in coltura, adese su vetrini, all'interno dei pozzetti, in condizioni statiche. La mancata attività proliferativa, come suggerito da diversi studi in letteratura, potrebbe anche essere indice di variazioni nell'attività cellulare dovuti all'inizio della fase di differenziamento. Tale effetto, tuttavia, non permane nel caso venga dispensata una quantità di media in largo eccesso all'interno delle piastre.

4.3.2.2 Studio della morfologia

Dopo aver riscontrato che il biomateriale non sortisce effetti negativi sulla vitalità cellulare (se il terreno di coltura è dispensato in largo eccesso), si è proceduto all'allestimento di un nuovo esperimento, con l'obiettivo di verificare gli effetti della perfusione sulla morfologia cellulare. Verrà comunque tenuto in considerazione l'impatto del materiale su cui sono adese le cellule, sulla loro conformazione geometrica. Tutti gli esperimenti condotti, infatti, hanno previsto la semina cellulare su vetrini, successivamente inseriti all'interno dei supporti in polistirene o biomateriale.

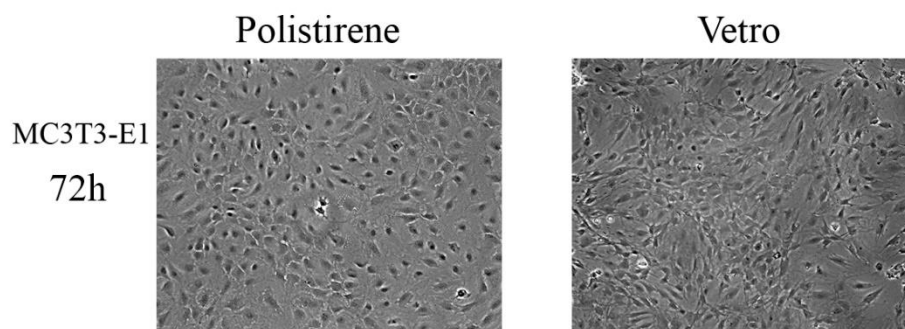


Figura 68 immagini a 72 ore di coltura nel caso statico di cellule MC3T3-E1 adese direttamente su piastra Petri standard in polistirene e su vetrino (12mm) in condizioni statiche, poggiate all'interno di una piastra in polistirene standard.

A riprova di tale effetto è possibile osservare in Figura 68 come le cellule adese al materiale vetroso assumano una morfologia, allo stesso istante temporale, leggermente diversa da quelle lasciate espandersi su piastra Petri standard, in polistirene. Le differenze fenotipiche rilevabili, probabilmente, sono causate dalle proprietà meccaniche, chimiche, strutturali e topografiche non perfettamente sovrapponibili dei due materiali, rimarcando l'importanza delle caratteristiche del supporto scelto, nello sviluppo delle cellule in coltura. Questa evidenza è stata, inoltre, largamente discussa in letteratura scientifica. [85] [97]

È stato, quindi, sterilizzato il case pompe e il relativo cablaggio con acqua distillata ed etanolo. Sono state seminate cellule MC3T3-E1 al passaggio 28 su vetrini del diametro di 15 mm.

In questo caso non è stata misurata quantitativamente la densità cellulare, poiché non si è ritenuto necessario un tale grado di precisione ai fini dell'esperimento. I set-up dell'esperimento sono riassunti nella Tabella 5.

Tabella 5: set-up di coltura delle cellule MC3T3-E1 E1 per lo studio dell'influenza del flusso sulla morfologia.

Tipo di coltura	Standard	Static	Dynamic (0,75 ml/min)
Linea cellulare	MC3T3-E1 (28° passaggio)	MC3T3-E1 (28° passaggio)	MC3T3-E1 (28° passaggio)
Densità cellulare	A confluenza	A confluenza	A confluenza
Diametro vetrino	Ø15 mm	Ø15 mm	Ø15 mm
Supporto	Piastra 12-well standard (Polistirene)	3DP-12-well (BiomedClear)	3DP-12-well (BiomedClear)
Terreno di coltura (α -MEM) dispensato	3 ml per pozzetto	40 ml totali	40 ml totali

La piastra 3DP-12-well del set-up “Dynamic” è stata connessa alla pompa peristaltica attraverso il circuito fluidico (i cui componenti erano stati, precedentemente, autoclavati). Per evitare di sottoporre le cellule alla maggiore turbolenza del flusso, che potrebbe svilupparsi nei pozzetti di ingresso e uscita, è stata esercitata l’accuratezza di introdurre i vetrini in una delle file centrali della piastra. La velocità della pompa è stata settata in modo da fornire la portata massima di 0,75 ml/min, attraverso i pozzetti.

Le piastre e il bioreattore sono stati posti all’interno dell’incubatore, sfruttando le guarnizioni dello stesso per far passare i cavi di collegamento connessi al controllore (rimasto all’esterno) ed evitando, così, un’eccessiva perturbazione delle condizioni di coltura (37°C, 5% CO₂). I risultati, ottenuti a time point successivi di 24, 48 e 72 ore possono essere osservati in Figura 69.

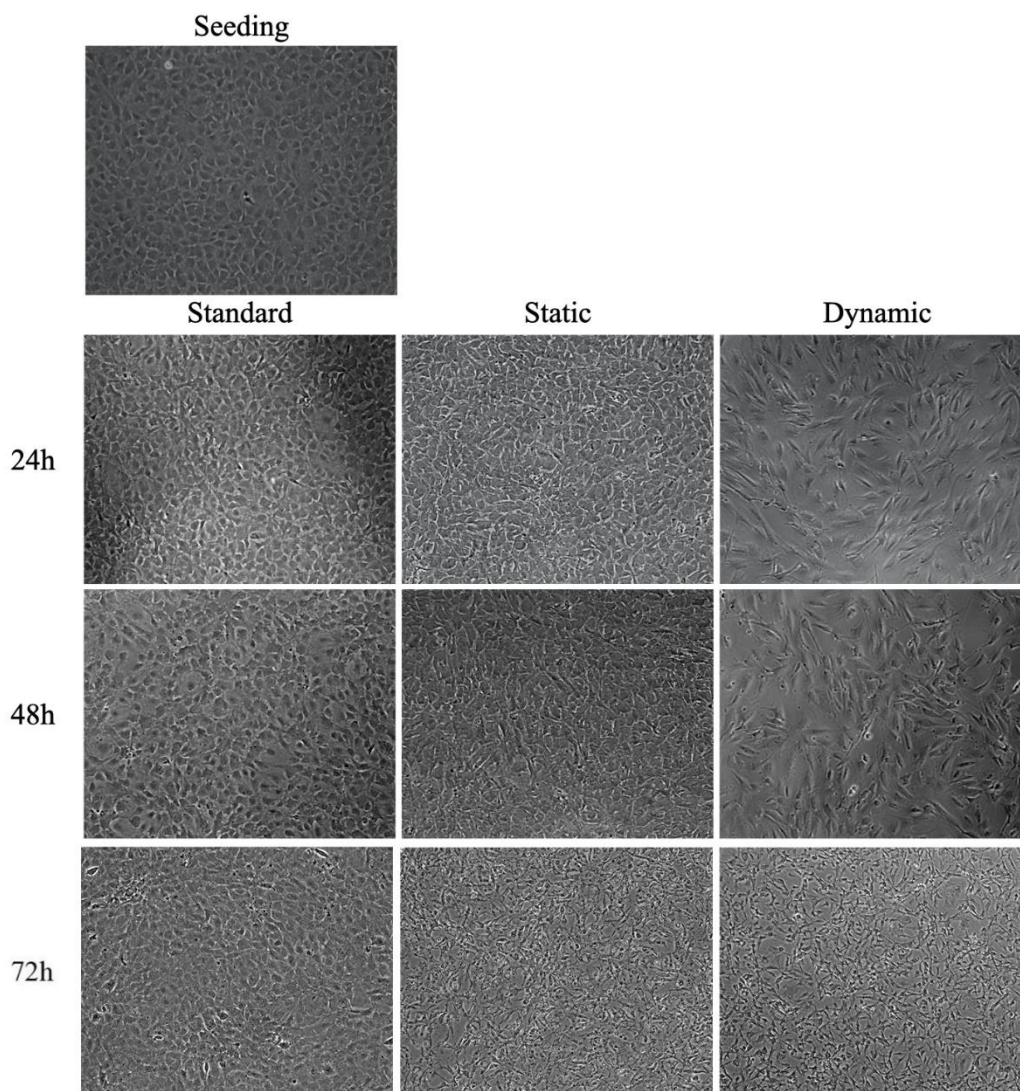


Figura 69 Immagini delle cellule MC3T3 ottenute tramite microscopia ottica subito dopo la semina (seeding) e dopo 24-48-72 ore di coltura su: piastra 12-well standard in polistirene (Standard), nel controllo statico su 3DP-12-well (Static) e nel caso dinamico su 3DP-12-well (Dynamic) a velocità massima di perfusione (0,75 ml/min).

È possibile osservare come la procedura di coltivazione “Dynamic” abbia avuto un impatto considerevole sulla morfologia delle cellule. Queste si presentano, già dopo 24 ore, più allungate e dal corpo cellulare sensibilmente più ampio, rispetto ai controlli statici, “Standard” e “Static”.

Dopo 48 ore, tale differenza è ancora più evidente ma, a 72 ore di coltura, il fenotipo mostrato dalle MC3T3-E1 sulle piastre 3DP-12-well ha subito una variazione in entrambi i casi “Static” e “Dynamic”, rispetto al controllo su piastra standard in polistirene. Su tale supporto, le MC3T3-E1 hanno proseguito con il processo di crescita già osservato in precedenza. Nelle piastre 3DP-12-well i nuclei si mostrano più marcati, con l’unica differenza fra le due che, nel “Dynamic”, le cellule si mostrano più allungate e sparpagliate rispetto a “Static”.

Alla luce delle differenze morfologiche riscontrate nei vari set-up, è possibile ipotizzare che il flusso abbia incentivato e reso più rapido il processo di estensione del corpo cellulare e facilitato la proliferazione delle MC3T3-E1. Prolungando i tempi di coltura è, perciò, possibile che anche le cellule in condizioni statiche avrebbero acquisito un fenotipo simile a quello osservato in dinamico a sole 72 ore. La forma affusolata ottenuta tramite la perfusione, inoltre, potrebbe ricordare quella dei fibroblasti inducendo così ad ipotizzare che stress di taglio e distribuzione più uniforme dei nutrienti abbiano accelerato il processo di differenziamento verso il fenotipo osteoblastico.

Questa possibilità potrebbe essere studiata, in futuro, tramite saggi di espressione genica o spettrofotometrici, per il rilevamento di una eventuale deposizione di ECM mineralizzata da parte delle cellule. Analizzando la letteratura riguardante la stimolazione fluidica di cellule MC3T3-E1 possono essere, comunque, osservati diversi studi in cui lo stress di taglio dovuto alla perfusione, induce una marcata risposta morfologica e fenotipica. Le cellule MC3T3-E1, infatti, sembrano essere in grado di rispondere con prontezza a questa tipologia di stimolo meccanico, in virtù della loro natura osteogenica.

È stato dimostrato, in particolare, che l’applicazione di un flusso può causare la riorganizzazione del citoscheletro alterando, di conseguenza, forma e volume della cellula e del nucleo. Tale cambiamento in risposta a stimoli esterni può essere osservato già nel giro di pochi minuti dall’applicazione degli stessi. [102]

Successivamente, si è passati alla verifica degli effetti che portate differenti possono avere sulla morfologia delle cellule MC3T3-E1. Queste, sono state seminate al centro di vetrini del diametro di 12 mm, alla densità di 5000 cellule/cm². I set-up sono riassunti in Tabella 6.

Tabella 6: set-up di coltura delle cellule MC3T3-E1 per lo studio degli effetti del flusso minimo e massimo sulla morfologia.

Tipo di coltura	Standard	Dynamic_Vmin (0,2 ml/min)	Dynamic_Vmax (0,75 ml/min)
Linea cellulare	MC3T3-E1 (30° passaggio)	MC3T3-E1 (30° passaggio)	MC3T3-E1 (30° passaggio)
Densità cellulare	5000 cellule/cm ²	5000 cellule/cm ²	5000 cellule/cm ²
Diametro vetrino	Ø15 mm	Ø15 mm	Ø15 mm
Supporto	Piastra 12-well standard (Polistirene)	3DP-12-well (BiomedClear)	3DP-12-well (BiomedClear)
Terreno di coltura (α -MEM) dispensato	1 ml per pozzetto	40 ml totali	40 ml totali

L'esperimento è stato impostato in modo simile al precedente ma, in questo caso, sono stati montati entrambi i percorsi fluidici del bioreattore, mantenendo la coltura su piastra in polistirene come controllo statico. Attraverso l'utilizzo dell'interfaccia grafica, una delle pompe è stata posta alla velocità massima di rotazione, mentre la seconda a velocità minima. Con tale configurazione è stato possibile generare portate di fluido rispettivamente di 0,75 ml/min e 0,2 ml/min.

I risultati sperimentali, raccolti a 24 e 72 ore, possono essere osservati in Figura 70.

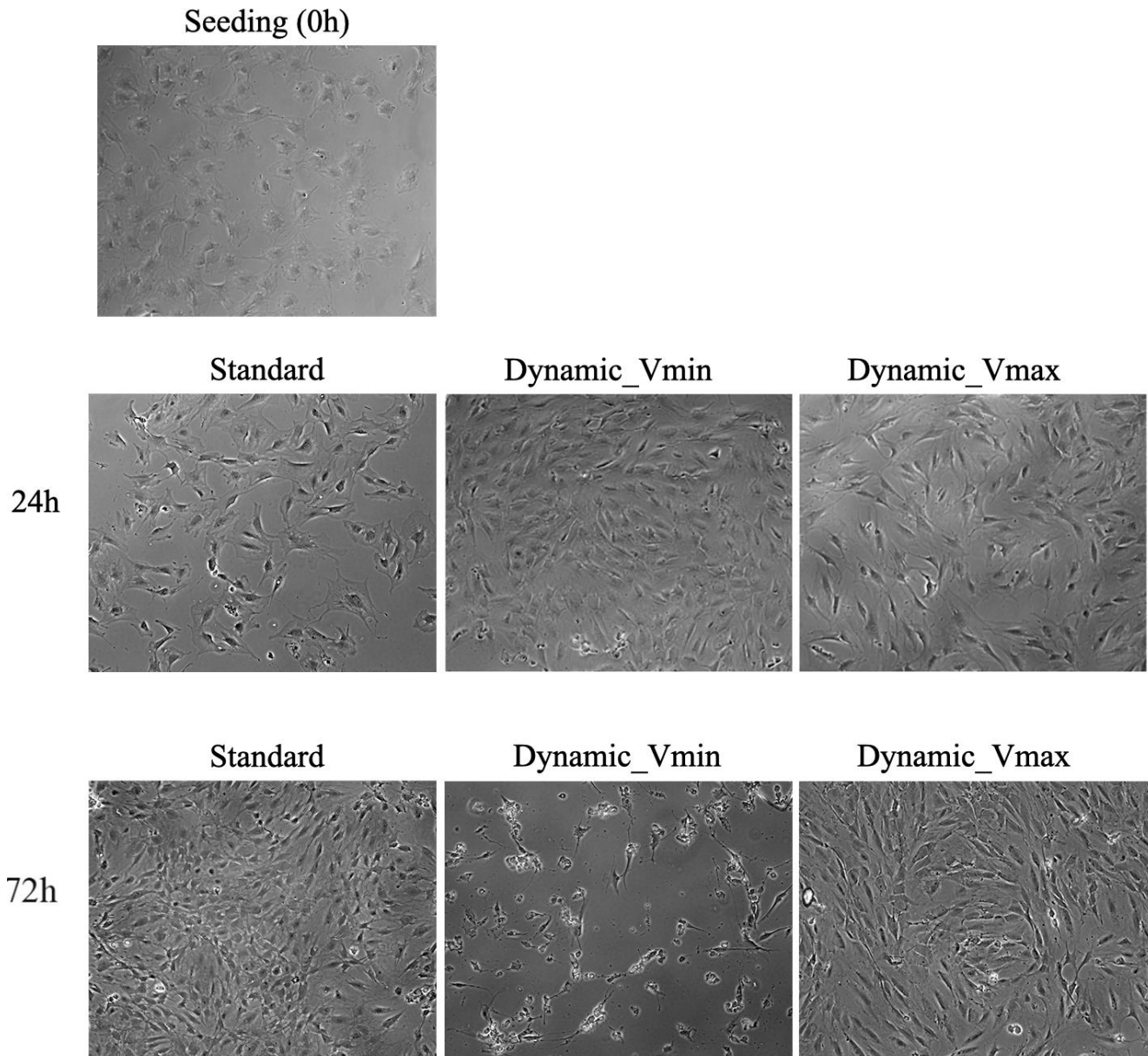


Figura 70 Immagini della coltura cellulare MT3C3-E1 al momento della semina, a 24 e a 72 ore di coltura. Le cellule adese ai vetrini sono coltivate in diverse condizioni. **Standard:** su piastra 12-well in polistirene. **Dynamic_Vmin:** condizioni dinamiche nel 3DP-12-well con la rotazione della pompa impostata a velocità minima (0,2 ml/min). **Dynamic_Vmax:** condizioni dinamiche nel 3DP-12-well con la rotazione della pompa impostata a velocità massima (0,75 ml/min).

Già nelle prime 24 ore di coltura si nota una differenza morfologia evidente nelle cellule coltivate in condizioni statiche, rispetto a quelle dinamiche. In particolare, le cellule sottoposte alla perfusione del flusso (sia di portata massima che minima) mostrano una minore tendenza a raggrupparsi, una forma allungata e un corpo cellulare più affusolato che sembra seguire, in certi punti, le linee del flusso. L'effetto è più evidente con una perfusione di entità maggiore: in linea con le

osservazioni riscontrate in letteratura, secondo cui i risultati morfologici riscontrabili sulle cellule hanno una dipendenza quasi lineare con l'intensità del flusso generato (all'interno di un certo range di shear stress). [102]

Nel caso "Dynamic_Vmin", inoltre, le cellule sembrano avere una maggiore propensione alla proliferazione, mentre in "Dynamic_Vmax" tale processo potrebbe essersi arrestato in favore di un principio di differenziamento.

Dopo 72 ore, il precedente risultato è confermato nella coltura "Dynamic_Vmax", in cui le cellule hanno evidentemente trovato un ambiente adeguato alla proliferazione, mentre nel caso di "Dynamic_Vmin" è stato riscontrato un deterioramento della coltura, meno vitale persino della condizione statica. Le cellule all'interno della piastra in polistirene, infatti, pur potendo usufruire di 1 solo ml di terreno di coltura hanno continuato la loro fase di crescita ed espansione raggiungendo lo stato confluyente.

La vitalità presentata nel caso "Dynamic_Vmax" indica, nuovamente, che le molecole nocive potenzialmente rilasciate dal materiale delle piastre 3DP-12-well, sortiscono un effetto trascurabile quando vengono portate in circolo e, di conseguenza, trascorrono meno tempo a contatto diretto con le membrane cellulari, evitando la formazione di depositi. Nel caso di "Dynamic_Vmin", invece, è ipotizzabile che il basso livello di flusso sia stato sufficiente a provocare un maggiore distacco di composti citotossici dal biomateriale, rispetto alle condizioni statiche, ma non a rimuoverli efficacemente dalla superficie dei monolayer. Tale effetto, pur non essendo stato evidenziato nelle prime 24 ore, potrebbe essersi manifestato raggiunte le 72 ore di coltura, a causa del superamento di una concentrazione limite di depositi nocivi sulle membrane cellulari, i quali hanno provocato la morte delle cellule stesse. Al risultato osservabile, inoltre, potrebbero aver contribuito uno shear stress insufficiente a provocare un adattamento fenotipico e una scarsa rimozione dei residui tossici liberati dal metabolismo cellulare.

Per la conferma dei risultati, si è prolungato il periodo di coltura ad una settimana, sostituendo il medium esausto all'interno dei pozzetti che ne contenevano solamente 1 ml. Sono, quindi, state valutate le colture più rilevanti: la "Dynamic_Vmax" e la "Standard". Le immagini in microscopia hanno confermato i dati a 72 ore, con una buona vitalità di entrambe le colture e una morfologia marcatamente più fusiforme nel caso dinamico. (Figura 71)

1w

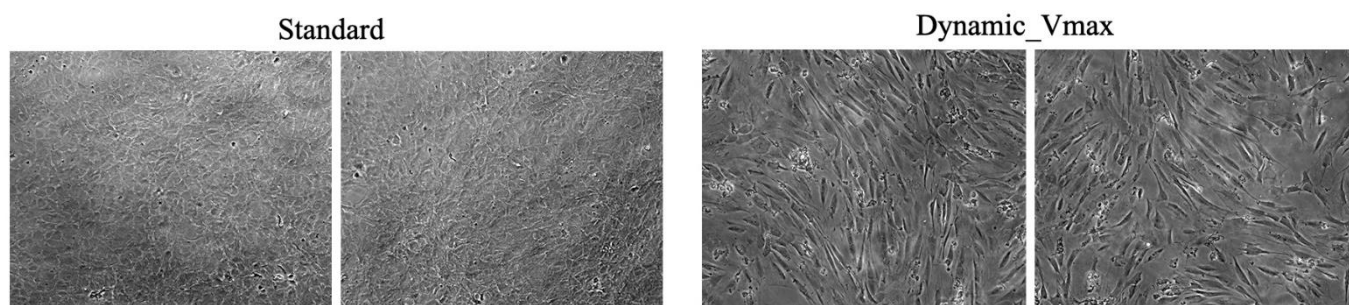


Figura 71 Cellule MC3T3-E1 dopo 1 settimana di coltura in condizioni statiche su piastra standard in polistirene (Standard) e in condizioni dinamiche a velocità massima nel 3DP-12-well (Dynamic_Vmax).

Questo esperimento ha evidenziato una chiara influenza del flusso e della sua intensità sulla morfologia delle cellule MC3T3-E1. Queste, se sottoposte a perfusione (e allo stress di taglio che ne deriva) assumono una forma affusolata, simile quella dei fibroblasti. Lo studio delle caratteristiche morfologiche delle cellule, in questo caso, suggerisce un passaggio da una fase di proliferazione ad una di differenziamento in tempi minori rispetto ai controlli statici. La portata del flusso, tuttavia, deve essere calibrata per fornire uno stimolo adeguato all'obiettivo prestabilito poiché, se troppo bassa, sarà in grado di incentivare, in modo preponderante, la proliferazione della coltura.

4.3.2.3 Studio dell'eccentricità

Per valutare quantitativamente la morfologia cellulare calcolata l'eccentricità (indice della forma del corpo cellulare, più o meno allungata) sfruttando il software ImageJ, su cellule portate a 72 ore di coltura (time point al quale le differenze fra statico e dinamico erano maggiormente evidenti). Sono state misurate le caratteristiche morfologiche (asse maggiore e minore) di un campione di 10 cellule casualmente selezionate nelle immagini delle colture "Dynamic_Vmax", "Static" e "Standard", mediando i risultati e calcolando l'eccentricità ($E = \sqrt{1 - \frac{b^2}{a^2}}$).

Tabella 7: risultati dell'analisi dell'eccentricità cellulare.

72h	Dynamic_Vmax	Static	Standard
Media asse maggiore [pixel]	103,86	30,38	31,10
Media asse minore [pixel]	30,37	21,25	26,93
E	0,956	0,715	0,5

Un parametro E maggiore indica una forma più affusolata della cellula e il fatto che il valore più elevato sia quello del caso dinamico, rispecchia le osservazioni qualitative effettuate tramite l'osservazione dell'immagine in microscopia.

4.3.3 Confronto MC3T3-E1 vs. Caco-2

Per valutare il comportamento di diverse popolazioni cellulari sottoposte ad un regime di coltura perfusivo, è stato avviato un nuovo esperimento. In questo caso sono state utilizzate cellule della linea Caco-2 al 17° passaggio e, in parallelo, delle cellule MC3T3-E1 al passaggio 29. Entrambe le linee cellulari sono state seminate su vetrini del diametro di 15 mm ad una densità cellulare non specifica. I set-up sperimentali utilizzati per le colture delle cellule MC3T3-E1 sono mostrati in Tabella 8, mentre quelli delle Caco-2 in Tabella 9:

Tabella 8: set-up di coltura delle cellule MC3T3-E1 nel test di confronto con Caco-2.

Tipo di coltura	Standard	Static	Dynamic (0,75 ml/min)
Linea cellulare	MC3T3-E1 (30° passaggio)	MC3T3-E1 (30° passaggio)	MC3T3-E1 (30° passaggio)
Densità cellulare	A confluenza	A confluenza	A confluenza
Diametro vetrino	Ø15 mm	Ø15 mm	Ø15 mm
Supporto	Piastra 12-well standard (Polistirene)	3DP-12-well (BiomedClear)	3DP-12-well (BiomedClear)
Terreno di coltura (α -MEM) dispensato	3 ml per pozzetto	40 ml totali	40 ml totali

Tabella 9: set-up di coltura delle cellule Caco-2 nel test di confronto con MC3T3-E1.

Tipo di coltura	Standard	Static	Dynamic (0,75 ml/min)
Linea cellulare	Caco-2 (17° passaggio)	Caco-2 (17° passaggio)	Caco-2 (17° passaggio)
Densità cellulare	A confluenza	A confluenza	A confluenza
Diametro vetrino	Ø15 mm	Ø15 mm	Ø15 mm
Supporto	Piastra 12-well standard (Polistirene)	3DP-12-well (BiomedClear)	3DP-12-well (BiomedClear)
Terreno di coltura (DMEM) dispensato	3 ml per pozzetto	40 ml totali	40 ml totali

Le piastre 3DP-12-well Dynamic sono state collegate ai due circuiti fluidici indipendenti del bioreattore e le pompe sono state impostate, attraverso l'interfaccia grafica, per generare la portata massima di terreno di coltura (α -MEM per le MC3T3-E1 e DMEM per le Caco-2) di 0,75 ml/min.

Piastre statiche e bioreattore sono stati trasferiti all'interno dell'incubatore e l'analisi della morfologia è stata effettuata analizzando immagini raccolte dopo 24, 48 e 72 ore, tramite microscopia ottica in campo chiaro. In Figura 72 sono mostrati i risultati delle cellule MC3T3-E1 e in Figura 73 quelli relativi alle cellule Caco-2. Da questi ultimi, sono stati estrapolati alcuni dettagli salienti, osservati nella coltura "Dynamic" e riportati in Figura 74.

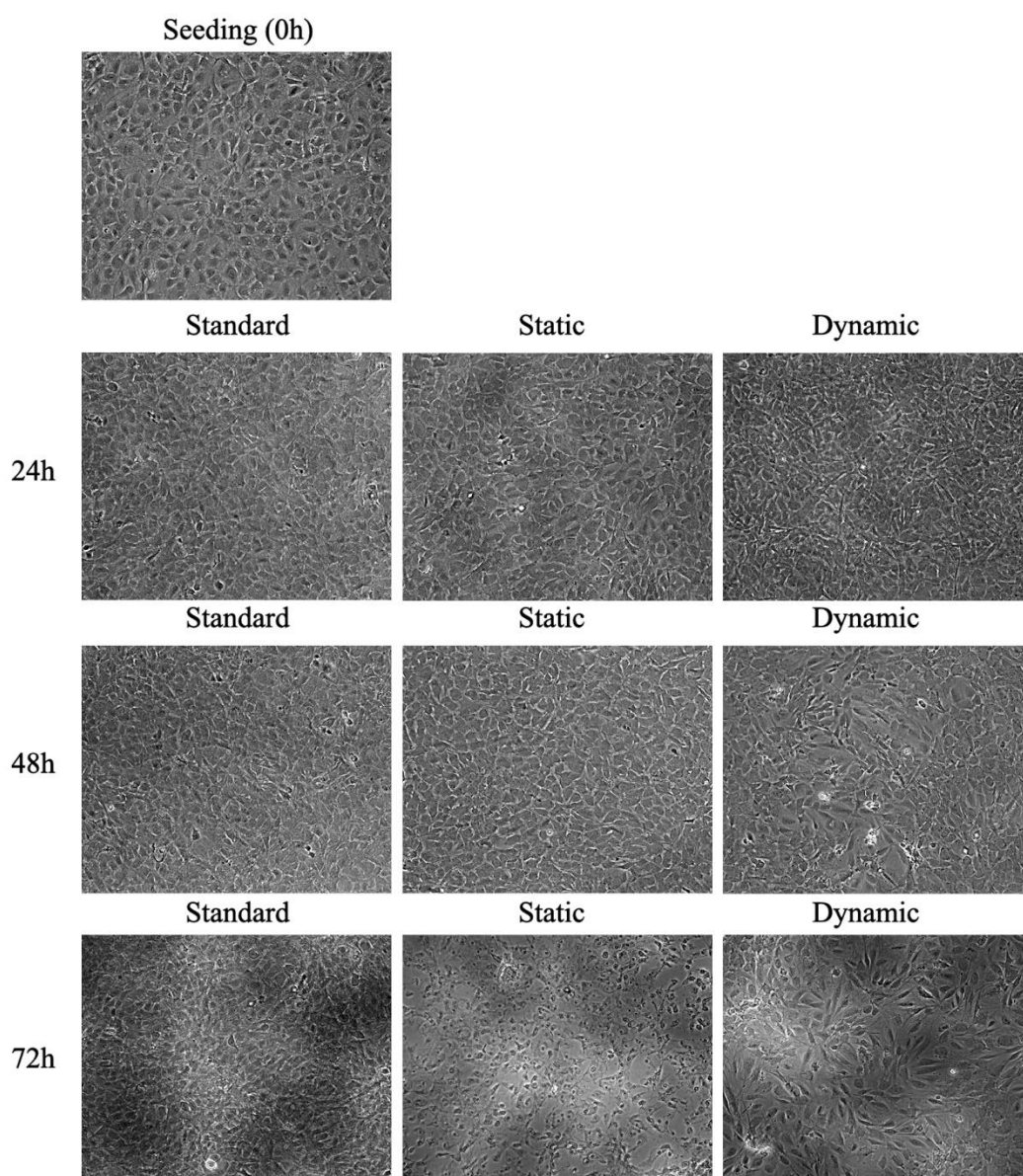


Figura 72 Immagini in microscopia ottica in campo chiaro della coltura di cellule MC3T3-E1 al momento della semina, a 24, 48 e 72 di coltura nelle condizioni standard su piastra standard in polistirene, statica su 3DP-12-well e dinamica a portata massima imponibile (0,75ml).

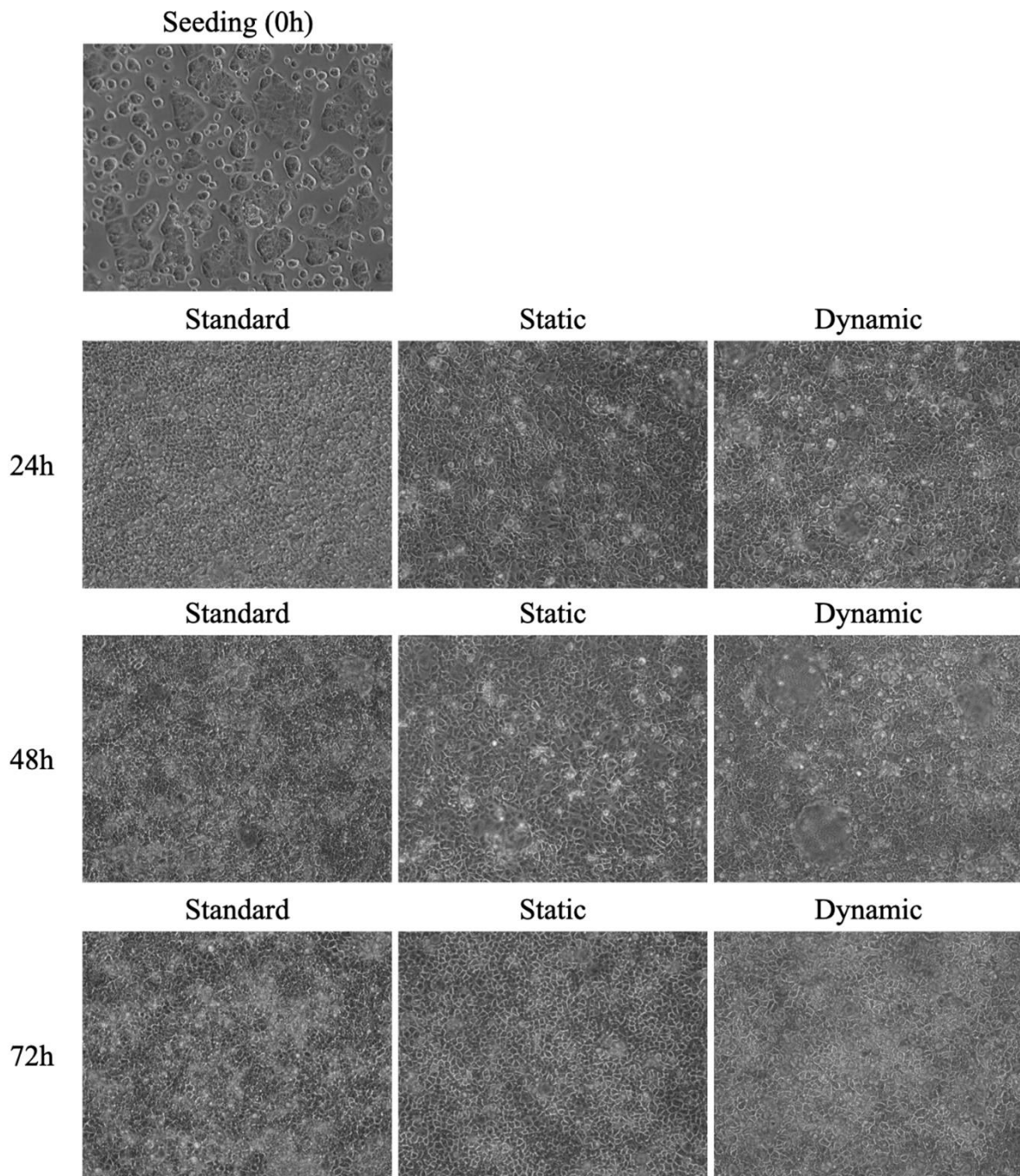


Figura 73 Immagini in microscopia ottica in campo chiaro della coltura di cellule Caco-2 al momento della semina, a 24, 48 e 72 di coltura nelle condizioni standard su piastra standard in polistirene, statica su 3DP-12-well e dinamica a portata massima imponibile (0,75ml).

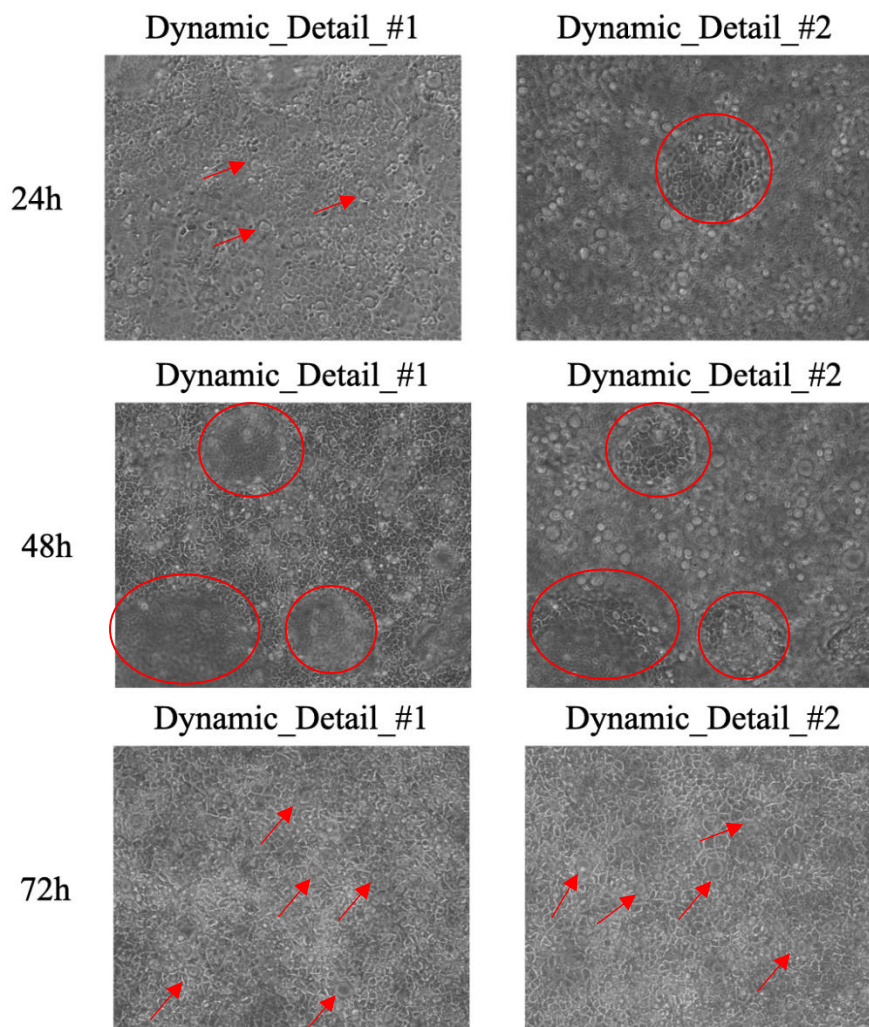


Figura 74 Dettagli osservabili nella coltura dinamica di cellule Caco-2 a 24, 48 e 72 ore in condizioni dinamiche. I cerchi rossi mostrano alcune delle protrusioni che si innalzano sopra al piano del monolayer, mentre le frecce rosse indicano le formazioni vescicolari identificate in quantità maggiore nel caso dinamico rispetto allo statico.

Attraverso l'analisi dei monolayer è nuovamente riscontrabile una forma maggiormente affusolata delle cellule MC3T3-E1 in "Dynamic", già nelle prime 24 ore. Tale variazione morfologica viene accentuata a 48 e 72 ore, confermando l'effetto del flusso sulla conformazione delle cellule. In "Standard" e "Static", invece, la morfologia rimane più tondeggiante. Questi risultati si rivelano, perciò, in linea con quelli ottenuti sulla stessa tipologia cellulare negli esperimenti precedenti.

La stessa modalità di verifica è stata applicata alle cellule Caco-2. In questo caso, le differenze fra protocollo di coltura statico e dinamico possono essere individuate in una maggiore quantità di vescicole e protrusioni, nel caso "Dynamic". Una caratterizzazione di tali formazioni sopraelevate, potrebbe essere suggerita da alcuni studi presentati in letteratura. È stato riscontrato, infatti, come uno stimolo fluidico possa portare ad una riorganizzazione morfologica del monolayer, con una altezza maggiore delle cellule Caco-2 e la formazione spontanea di strutture fibrose simili a villi e cripte. [27]

Il fenomeno è più facilmente osservabile e analizzabile attraverso un'ispezione in sezione trasversale del monolayer, che potrebbe essere performata in uno studio successivo. È presumibile, tuttavia, che le protrusioni osservabili nel set-up dinamico del bioreattore da noi progettato, abbiano la medesima origine e struttura rispetto a quelle citate in letteratura.

Questo risultato è di particolare rilevanza, poiché un modello *in vitro* morfologicamente più rappresentativo all'ambiente biologico che si vuole riprodurre (e ottenibile in tempi minori rispetto alle colture statiche) potrebbe rivelarsi uno strumento particolarmente affidabile e attendibile in ambito di ricerca.

Inoltre, effettuando un saggio molecolare o di espressione genica, potrebbe essere rilevata l'attivazione di vie molecolari e metaboliche associabili a un particolare tipo di sviluppo cellulare, causato dalla perfusione. A tali strategie di analisi potrebbero essere affiancati ulteriori test, caratterizzati da flussi con portate differenti da quella sfruttata nel nostro caso.

4.4 Analisi dei costi di produzione

Il bioreattore fluidico presentato, si distingue per la sua semplicità di costruzione e utilizzo, oltre che per il basso costo di produzione. I costi approssimati dei vari componenti sono:

- ④ Case dell'unità pompe: 9,20€
 - ④ Pompe peristaltiche: 100€ ognuna. Per un totale di 200€.
 - ④ Sparkfun Easy Driver: 12,43€ ognuno. Per un totale di 24,86€.
 - ④ Case dell'unità di controllo: 15,8 €.
 - ④ Arduino uno: 20€.
 - ④ Alimentatore 12v: 9,5€.
 - ④ I cavi utilizzati per il collegamento fra i Drivers e le pompe (due cavi di rete della lunghezza di tre metri): 4,66€ ognuno, per un costo totale di 9,32€.
 - ④ Per le parti stampate in 3D va considerato un prezzo al litro di resina BiomeClear pari a 315€. Per la realizzazione di ognuno dei 3DP-12-well sono stati utilizzati 47 ml corrispondenti a 14,8€ portando il costo per la produzione delle 4 piastre a 59,2€, mentre per ogni coperchio sono stati impiegati 51 ml di resina, corrispondenti a 16€ per un totale di 64€.
- La stampante Form 3B utilizzata, può essere acquistata ad un prezzo base di circa 3800€: costo non eccessivamente proibitivo, soprattutto se confrontato con le attrezzature necessarie per la produzione di strutture più complesse e miniaturizzate come alcuni OOC o con stampanti 3D di fascia più alta che possono superare i 10000€.

Andando a sommare le varie spese si raggiungono 288,68€ per la circuiteria e 123,2€ per il materiale di realizzazione delle stampe in 3D. Il costo dell'intero bioreattore si attesta, quindi, attorno ai 411,88€ ai quali andrà sommato quello per il cablaggio della circuiteria e per le tubazioni, comunque irrisorio.

Come termine comparativo può essere preso in considerazione il prezzo di £993 (circa 1180€) del kit di base proposto per il bioreattore a perfusione Quasi Vivo[®]. Ad esso andranno sommato il costo della pompa peristaltica a 6 canali di £4600 (circa 5468€), per una spesa totale di £5593, pari a 6649€. [122]

4.5 Conclusioni e prospettive future

Il bioreattore a perfusione presentato, si è rivelato in grado di fornire a diversi tipi di linee cellulari una piattaforma efficace, poco costosa e di facile utilizzo per lo sviluppo di un ambiente dinamico che possa incentivare la proliferazione cellulare e modificare la morfologia della coltura, fornendo i corretti stimoli. Il regime di perfusione ha fornito il ricircolo continuo del medium, provocando un più uniforme gradiente di concentrazione di ossigeno e nutrienti a disposizione delle cellule, oltre a provvedere alla rimozione dei prodotti metabolici rilasciati dalle cellule stesse. Lo stress di taglio originato dallo scorrimento dei piani fluidi (in un regime approssimabile a laminare a parte a livello delle imboccature di ingresso e uscita delle piastre), come evidenziato dai diversi studi, fornisce un ulteriore stimolo allo sviluppo delle cellule seminate e all'indirizzamento del fenotipo.

Le piastre 3DP-12-well create ad hoc, in virtù del design provvisto di 12 pozzetti interconnessi, sono in grado di fornire uno throughput rilevante rispetto ad altri bioreattori che comprendono una sola camera a perfusione. I connettori Spiros[®]/MicroClave[®], rendendo il sistema modulare, permettono lo studio sotto cappa delle colture, in condizioni di sterilità, particolarmente agevole.

L'interfaccia grafica, anch'essa sviluppata appositamente per adattarsi alle necessità dello studio, è intuitiva, di semplice comprensione e può essere installata su qualunque calcolatore rendendo, così, la piattaforma utilizzabile in diversi laboratori.

La possibilità di controllare indipendentemente la velocità di rotazione e il verso delle pompe (e di conseguenza la portata del flusso e lo stress di taglio generato), rende il sistema adattabile a molteplici applicazioni e protocolli di studio. La capacità di avviare la perfusione in istanti temporali differenti e verificare gli effetti di una variazione nella portata del flusso o di un suo completo arresto,

passando da una situazione dinamica a statica (o viceversa), sono esempi concreti delle opportunità sfruttabili tramite il bioreattore.

Il costo di produzione, come precedentemente mostrato, è contenuto rispetto ad altri modelli in commercio e tutti i componenti elettronici all'interno delle unità pompe e di controllo, sono commercialmente disponibili e facilmente reperibili nel caso di un possibile guasto.

I risultati riscontrati sulle cellule in coltura, durante il corso dell'esperimento, suggeriscono una netta modulazione dell'aspetto morfologico delle MC3T3-E1 nel caso dinamico, rispetto a quello statico, già dopo 24 ore di coltura. L'aspetto allungato e fusiforme ottenuto con il regime di perfusione ricorda quello dei fibroblasti maturi e ciò potrebbe essere interpretato come l'indizio di una prima fase di differenziamento. Lo stesso vale per le cellule Caco-2, le quali dimostrano variazioni nella struttura stessa del monolayer, il quale sembra assumere, già dopo 72 ore di coltura, una struttura tridimensionale che ricorda quella dell'epitelio intestinale, ripiegato in villi e cripte.

L'informazione estrapolabile dalle immagini ottenute tramite microscopia ottica è, perciò, che il flusso ha impresso alle cellule uno stimolo sufficiente a deformarne la morfologia permettendone, allo stesso tempo, un buon tasso di proliferazione, comparabile o superiore alle colture statiche. Di particolare rilevanza è anche la constatazione dell'influenza potenzialmente negativa del biomateriale (resina BiomedClear) con cui sono state stampate le piastre, sulle cellule in coltura. Questo dato potrebbe essere comparato, in successivi esperimenti, con quello ottenuto attraverso la stampa dei 3DP-12-well con altre tipologie di resine polimeriche. Inoltre, è ipotizzabile che lavaggi maggiormente approfonditi e ripetuti effettuati prima di condurre gli esperimenti, potrebbero essere sufficienti ad annullare l'ulteriore rilascio di composti monomerici tossici dalle piastre.

Una delle migliorie che potrebbero essere apportate ad una futura e più completa versione del dispositivo, riguarda la miniaturizzazione del sistema attraverso lo sviluppo di un case pompe che permetta di alloggiare le piastre occupando, tuttavia, un volume minore all'interno dell'incubatore, favorendo anche la maneggevolezza del bioreattore. Inoltre, l'interfaccia grafica potrebbe essere riprodotta attraverso un display direttamente applicato sulla superficie dell'unità di controllo permettendo, così, di omettere la connessione fissa al computer per il controllo delle pompe.

In diversi lavori, è stato esplorato l'effetto di un flusso di natura pulsatile sul comportamento cellulare. L'aggiunta di un'opzione apposita per innescare la pulsatilità della perfusione, attivabile attraverso l'interfaccia grafica (impostando diverse ampiezze e frequenze di oscillazione), sarebbe una miglioria in grado di favorire un'esplorazione più approfondita della risposta delle colture in esame ad un ampio range di stimoli fluidici differenti e variegati.

Un cablaggio di diverso tipo potrebbe essere sfruttato per la connessione delle due unità poiché, malgrado i classici cavi di sezione cilindrica utilizzati, abbiano dimostrato di non causare una perturbazione dell'ambiente all'interno dell'incubatore passando attraverso la guarnizione, cavi piatti potrebbero essere ancora più discreti e meno impattanti sulla tenuta stagna dell'apparecchio, il cui scopo, è quello di fornire un ambiente finemente controllato.

Le piastre potrebbero, a loro volta, essere rese più compatte, pur mantenendo la compatibilità con quelle standard in polistirene, in modo da richiedere una quantità minore di terreno di coltura per rendere possibile il flusso. Potrebbe essere ampliata la modularità, studiando un percorso fluidico che permetta di connettere diverse piastre, andando così ad interfacciare fra loro (attraverso il flusso del medium progressivamente arricchito dei metaboliti cellulari) diverse colture cellulari, in grado di rappresentare i modelli degli organi biologici che comunicano all'interno del corpo.

Aumentando il numero dei pozzetti, inoltre, sarebbe ottenibile un incremento dello throughput mentre, progettando le piastre attraverso il metodo, rapido, scalabile e facilmente adattabile della stampa 3D, sarebbe possibile adattare alle specifiche linee cellulari in esame. Nei casi specifici di cellule Caco-2 e MC3T3-E1, sarebbe vantaggioso poter usufruire, rispettivamente, di inserti rimovibili simili a quelli dei Transwell® per valutare l'assorbimento intestinale (pur complicando il sistema, per sopperire alla necessità di generare i due ambienti fluidici apicale e basolaterale) e di camere in grado di alloggiare scaffold porosi tridimensionali, nei quali le cellule osteogeniche potrebbero proliferare più efficacemente, ritrovando un ambiente più simile a quello *in vivo*.

Una problematica tipica dei dispositivi fluidici nei quali vengono effettuati esperimenti a medio e lungo termine (che possono raggiungere durate di diverse settimane) è quella del ricambio del terreno di coltura esausto. Questa operazione deve essere effettuata manualmente e comporta, quindi, la manipolazione delle cellule che, a sua volta, presenta come inevitabile conseguenza, la perturbazione dell'ambiente di crescita cellulare da parte dell'operatore. Inoltre, un cambio totale di terreno può provocare reazioni avverse da stress nelle cellule. Per ovviare a questa problematica, un sistema di reservoir in grado di permettere un autofill continuo del sistema e la raccolta del medium esausto, potrebbe rendere la piattaforma maggiormente automatizzata e di facile utilizzo.

Infine, la rilevazione online di parametri di rilievo, attraverso l'apposizione di sensori direttamente all'interno delle piastre o del case pompe, permetterebbe una visione più ampia e dettagliata dell'attività cellulare e delle caratteristiche del flusso, diminuendo ulteriormente la necessità di manipolazione della piattaforma durante il periodo di coltura.

Bibliografia:

- [1] D. L. Hughes, A. Hughes, Z. Soonawalla, S. Mukherjee, e E. O'Neill, «Dynamic Physiological Culture of Ex Vivo Human Tissue: A Systematic Review», *Cancers*, vol. 13, n. 12, pag. 2870, giu. 2021, doi: 10.3390/cancers13122870.
- [2] M. V. Lipreri, N. Baldini, G. Graziani, e S. Avnet, «Perfused Platforms to Mimic Bone Microenvironment at the Macro/Milli/Microscale: Pros and Cons», *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 9, pag. 760667, gen. 2022, doi: 10.3389/fcell.2021.760667.
- [3] S. Ahmed, V. M. Chauhan, A. M. Ghaemmaghami, e J. W. Aylott, «New generation of bioreactors that advance extracellular matrix modelling and tissue engineering», *Biotechnol. Lett.*, vol. 41, n. 1, pagg. 1–25, gen. 2019, doi: 10.1007/s10529-018-2611-7.
- [4] M. S. B. Reddy, D. Ponnamma, R. Choudhary, e K. K. Sadasivuni, «A Comparative Review of Natural and Synthetic Biopolymer Composite Scaffolds», *Polymers*, vol. 13, n. 7, pag. 1105, mar. 2021, doi: 10.3390/polym13071105.
- [5] D. E. S. Nogueira, J. M. S. Cabral, e C. A. V. Rodrigues, «Single-Use Bioreactors for Human Pluripotent and Adult Stem Cells: Towards Regenerative Medicine Applications», *Bioengineering*, vol. 8, n. 5, pag. 68, mag. 2021, doi: 10.3390/bioengineering8050068.
- [6] J. Costa e A. Ahluwalia, «Advances and Current Challenges in Intestinal in vitro Model Engineering: A Digest», *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 7, pag. 144, giu. 2019, doi: 10.3389/fbioe.2019.00144.
- [7] L. Debellis e A. Poli, *Alimentazione, Nutrizione e Salute*, 1^a ed. EdiSES.
- [8] Dee U. Silverthorn, *Fisiologia umana. Un approccio integrato*.
- [9] S. Hua, «Advances in Oral Drug Delivery for Regional Targeting in the Gastrointestinal Tract - Influence of Physiological, Pathophysiological and Pharmaceutical Factors», *Front. Pharmacol.*, vol. 11, pag. 524, apr. 2020, doi: 10.3389/fphar.2020.00524.
- [10] J. L. Round e S. K. Mazmanian, «The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease», *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 9, n. 5, pagg. 313–323, mag. 2009, doi: 10.1038/nri2515.
- [11] C. L. Maynard, C. O. Elson, R. D. Hatton, e C. T. Weaver, «Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system», *Nature*, vol. 489, n. 7415, pagg. 231–241, set. 2012, doi: 10.1038/nature11551.
- [12] J. Durack e S. V. Lynch, «The gut microbiome: Relationships with disease and opportunities for therapy», *J. Exp. Med.*, vol. 216, n. 1, pagg. 20–40, gen. 2019, doi: 10.1084/jem.20180448.
- [13] M. Takaki, H. Suzuki, e S. Nakayama, «Recent advances in studies of spontaneous activity in smooth muscle: Ubiquitous pacemaker cells», *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, vol. 102, n. 2–3, pagg. 129–135, giu. 2010, doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2010.05.007.
- [14] M. Spit, B.-K. Koo, e M. M. Maurice, «Tales from the crypt: intestinal niche signals in tissue renewal, plasticity and cancer», *Open Biol.*, vol. 8, n. 9, pag. 180120, set. 2018, doi: 10.1098/rsob.180120.
- [15] T. Zietek, W. A. D. Boomgaarden, e E. Rath, «Drug Screening, Oral Bioavailability and Regulatory Aspects: A Need for Human Organoids», *Pharmaceutics*, vol. 13, n. 8, pag. 1280, ago. 2021, doi: 10.3390/pharmaceutics13081280.
- [16] J. Creff, L. Malaquin, e A. Besson, «In vitro models of intestinal epithelium: Toward bioengineered systems», *J. Tissue Eng.*, vol. 12, pag. 204173142098520, gen. 2021, doi: 10.1177/2041731420985202.
- [17] I. Schoultz e Å. V. Keita, «The Intestinal Barrier and Current Techniques for the Assessment of Gut Permeability», *Cells*, vol. 9, n. 8, pag. 1909, ago. 2020, doi: 10.3390/cells9081909.
- [18] P. Artursson, K. Palm, e K. Luthman, «Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport», *Adv. Drug Deliv. Rev.*, pag. 17, 2001.

- [19] T.-T.-L. Nguyen, V.-A. Duong, e H.-J. Maeng, «Pharmaceutical Formulations with P-Glycoprotein Inhibitory Effect as Promising Approaches for Enhancing Oral Drug Absorption and Bioavailability», *Pharmaceutics*, vol. 13, n. 7, pag. 1103, lug. 2021, doi: 10.3390/pharmaceutics13071103.
- [20] S. Yang e M. Yu, «Role of Goblet Cells in Intestinal Barrier and Mucosal Immunity», *J. Inflamm. Res.*, vol. Volume 14, pagg. 3171–3183, lug. 2021, doi: 10.2147/JIR.S318327.
- [21] Y. Xiang, H. Wen, Y. Yu, M. Li, X. Fu, e S. Huang, «Gut-on-chip: Recreating human intestine in vitro», *J. Tissue Eng.*, vol. 11, pag. 204173142096531, gen. 2020, doi: 10.1177/2041731420965318.
- [22] G. E. Kaiko *et al.*, «The Colonic Crypt Protects Stem Cells from Microbiota-Derived Metabolites», *Cell*, vol. 165, n. 7, pagg. 1708–1720, giu. 2016, doi: 10.1016/j.cell.2016.05.018.
- [23] A. J. M. Santos, Y.-H. Lo, A. T. Mah, e C. J. Kuo, «The Intestinal Stem Cell Niche: Homeostasis and Adaptations», *Trends Cell Biol.*, vol. 28, n. 12, pagg. 1062–1078, dic. 2018, doi: 10.1016/j.tcb.2018.08.001.
- [24] G. B. Hatton, C. M. Madla, S. C. Rabbie, e A. W. Basit, «All disease begins in the gut: Influence of gastrointestinal disorders and surgery on oral drug performance», *Int. J. Pharm.*, vol. 548, n. 1, pagg. 408–422, set. 2018, doi: 10.1016/j.ijpharm.2018.06.054.
- [25] L. Han *et al.*, «Altered metabolome and microbiome features provide clues in understanding irritable bowel syndrome and depression comorbidity», *ISME J.*, nov. 2021, doi: 10.1038/s41396-021-01123-5.
- [26] G. F. Longstreth, W. G. Thompson, W. D. Chey, L. A. Houghton, F. Mearin, e R. C. Spiller, «Functional Bowel Disorders», *Gastroenterology*, vol. 130, n. 5, pagg. 1480–1491, apr. 2006, doi: 10.1053/j.gastro.2005.11.061.
- [27] H. J. Kim, D. Huh, G. Hamilton, e D. E. Ingber, «Human gut-on-a-chip inhabited by microbial flora that experiences intestinal peristalsis-like motions and flow», *Lab. Chip*, vol. 12, n. 12, pag. 2165, 2012, doi: 10.1039/c2lc40074j.
- [28] L. Antoni, «Intestinal barrier in inflammatory bowel disease», *World J. Gastroenterol.*, vol. 20, n. 5, pag. 1165, 2014, doi: 10.3748/wjg.v20.i5.1165.
- [29] M. Pratt, J. D. Forbes, N. C. Knox, C. N. Bernstein, e G. Van Domselaar, «Microbiome-Mediated Immune Signaling in Inflammatory Bowel Disease and Colorectal Cancer: Support From Meta-omics Data», *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 9, pag. 716604, nov. 2021, doi: 10.3389/fcell.2021.716604.
- [30] T. Sawicki, M. Ruskowska, A. Danielewicz, E. Niedźwiedzka, T. Arłukowicz, e K. E. Przybyłowicz, «A Review of Colorectal Cancer in Terms of Epidemiology, Risk Factors, Development, Symptoms and Diagnosis», *Cancers*, vol. 13, n. 9, pag. 2025, apr. 2021, doi: 10.3390/cancers13092025.
- [31] G. Ibáñez-Sanz, R. Sanz-Pamplona, M. Garcia, e on behalf of the MSIC-SC Research Group, «Future Prospects of Colorectal Cancer Screening: Characterizing Interval Cancers», *Cancers*, vol. 13, n. 6, pag. 1328, mar. 2021, doi: 10.3390/cancers13061328.
- [32] G. Losurdo, F. S. D’Abramo, G. Indellicati, C. Lillo, E. Ierardi, e A. Di Leo, «The Influence of Small Intestinal Bacterial Overgrowth in Digestive and Extra-Intestinal Disorders», *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, n. 10, pag. 3531, mag. 2020, doi: 10.3390/ijms21103531.
- [33] J. Bures, «Small intestinal bacterial overgrowth syndrome», *World J. Gastroenterol.*, vol. 16, n. 24, pag. 2978, 2010, doi: 10.3748/wjg.v16.i24.2978.
- [34] J. Li *et al.*, «Mucosa-Associated Microbial Profile Is Altered in Small Intestinal Bacterial Overgrowth», *Front. Microbiol.*, vol. 12, pag. 710940, lug. 2021, doi: 10.3389/fmicb.2021.710940.
- [35] M. Camilleri, «Leaky gut: mechanisms, measurement and clinical implications in humans», *Gut*, vol. 68, n. 8, pagg. 1516–1526, ago. 2019, doi: 10.1136/gutjnl-2019-318427.

- [36] A. Fasano, «All disease begins in the (leaky) gut: role of zonulin-mediated gut permeability in the pathogenesis of some chronic inflammatory diseases», *F1000Research*, vol. 9, pag. 69, gen. 2020, doi: 10.12688/f1000research.20510.1.
- [37] V. Bansal, R. Malviya, T. Malaviya, e P. K. Sharma, «Novel Prospective in Colon Specific Drug Delivery System», pag. 10.
- [38] S. A. Peters, C. R. Jones, A.-L. Ungell, e O. J. D. Hatley, «Predicting Drug Extraction in the Human Gut Wall: Assessing Contributions from Drug Metabolizing Enzymes and Transporter Proteins using Preclinical Models», *Clin. Pharmacokinet.*, vol. 55, n. 6, pagg. 673–696, giu. 2016, doi: 10.1007/s40262-015-0351-6.
- [39] S. C. Pearce, H. G. Coia, J. P. Karl, I. G. Pantoja-Feliciano, N. C. Zachos, e K. Racicot, «Intestinal in vitro and ex vivo Models to Study Host-Microbiome Interactions and Acute Stressors», *Front. Physiol.*, vol. 9, pag. 1584, nov. 2018, doi: 10.3389/fphys.2018.01584.
- [40] «Ex_vivo_InTESTine_Liver». http://www.tno-pharma.com/Intestine_en.html (consultato 1 febbraio 2022).
- [41] S. Koehler, A. Springer, N. Issel, S. Klinger, C. Strube, e G. Breves, «Changes in porcine nutrient transport physiology in response to *Ascaris suum* infection», *Parasit. Vectors*, vol. 14, n. 1, pag. 533, dic. 2021, doi: 10.1186/s13071-021-05029-1.
- [42] F. Ghiselli, B. Rossi, A. Piva, e E. Grilli, «Assessing Intestinal Health. In Vitro and Ex vivo Gut Barrier Models of Farm Animals: Benefits and Limitations», *Front. Vet. Sci.*, vol. 8, pag. 723387, nov. 2021, doi: 10.3389/fvets.2021.723387.
- [43] D. C. Stewart *et al.*, «Quantitative assessment of intestinal stiffness and associations with fibrosis in human inflammatory bowel disease», *PLOS ONE*, vol. 13, n. 7, pag. e0200377, lug. 2018, doi: 10.1371/journal.pone.0200377.
- [44] R. G. Lentle e P. W. M. Janssen, «Physical characteristics of digesta and their influence on flow and mixing in the mammalian intestine: a review», *J. Comp. Physiol. B*, vol. 178, n. 6, pagg. 673–690, ago. 2008, doi: 10.1007/s00360-008-0264-x.
- [45] T. Sbrana *et al.*, «Dual flow bioreactor with ultrathin microporous TEER sensing membrane for evaluation of nanoparticle toxicity», *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 223, pagg. 440–446, feb. 2016, doi: 10.1016/j.snb.2015.09.078.
- [46] D. Cei *et al.*, «A bioreactor with an electro-responsive elastomeric membrane for mimicking intestinal peristalsis», *Bioinspir. Biomim.*, vol. 12, n. 1, pag. 016001, dic. 2016, doi: 10.1088/1748-3190/12/1/016001.
- [47] C. Awortwe, P. S. Fasinu, e B. Rosenkranz, «Application of Caco-2 Cell Line in Herb-Drug Interaction Studies: Current Approaches and Challenges», *J. Pharm. Pharm. Sci.*, vol. 17, n. 1, pag. 1, gen. 2014, doi: 10.18433/J30K63.
- [48] X.-G. Li, M. Chen, S. Zhao, e X. Wang, «Intestinal Models for Personalized Medicine: from Conventional Models to Microfluidic Primary Intestine-on-a-chip», *Stem Cell Rev. Rep.*, giu. 2021, doi: 10.1007/s12015-021-10205-y.
- [49] «Transwell® Permeable Supports | Guidelines for Use | Corning». <https://www.corning.com/worldwide/en/products/life-sciences/products/permeable-supports/transwell-guidelines.html> (consultato 1 febbraio 2022).
- [50] P. V. Balimane e S. Chong, «Cell culture-based models for intestinal permeability: A critique», *Drug Discov. Today*, vol. 10, n. 5, pagg. 335–343, mar. 2005, doi: 10.1016/S1359-6446(04)03354-9.
- [51] L. Cacopardo *et al.*, «Real-time cellular impedance monitoring and imaging of biological barriers in a dual-flow membrane bioreactor», *Biosens. Bioelectron.*, vol. 140, pag. 111340, set. 2019, doi: 10.1016/j.bios.2019.111340.
- [52] K. Benson, S. Cramer, e H.-J. Galla, «Impedance-based cell monitoring: barrier properties and beyond», *Fluids Barriers CNS*, vol. 10, n. 1, pag. 5, dic. 2013, doi: 10.1186/2045-8118-10-5.

- [53] D. Günzel, S. M. Krug, R. Rosenthal, e M. Fromm, «Biophysical Methods to Study Tight Junction Permeability», in *Current Topics in Membranes*, vol. 65, Elsevier, 2010, pagg. 39–78. doi: 10.1016/S1063-5823(10)65003-X.
- [54] «Automated TEER measurement systems - nanoAnalytics EN». <https://www.nanoanalytics.com/en/products/cellzscope.html>
- [55] P. Artursson e J. Karlsson, «Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells», *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 175, n. 3, pagg. 880–885, mar. 1991, doi: 10.1016/0006-291X(91)91647-U.
- [56] M. J. C. Santbergen, M. van der Zande, A. Gerssen, H. Bouwmeester, e M. W. F. Nielen, «Dynamic in vitro intestinal barrier model coupled to chip-based liquid chromatography mass spectrometry for oral bioavailability studies», *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 412, n. 5, pagg. 1111–1122, feb. 2020, doi: 10.1007/s00216-019-02336-6.
- [57] L. Wang, S. K. Murthy, W. H. Fowle, G. A. Barabino, e R. L. Carrier, «Influence of micro-well biomimetic topography on intestinal epithelial Caco-2 cell phenotype», *Biomaterials*, vol. 30, n. 36, pagg. 6825–6834, dic. 2009, doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.08.046.
- [58] X. Deng, G. Zhang, C. Shen, J. Yin, e Q. Meng, «Hollow fiber culture accelerates differentiation of Caco-2 cells», *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 97, n. 15, pagg. 6943–6955, ago. 2013, doi: 10.1007/s00253-013-4975-x.
- [59] J. Yu, S. Peng, D. Luo, e J. C. March, «In vitro 3D human small intestinal villous model for drug permeability determination», *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 109, n. 9, pagg. 2173–2178, set. 2012, doi: 10.1002/bit.24518.
- [60] C. M. Costello *et al.*, «Synthetic small intestinal scaffolds for improved studies of intestinal differentiation: Synthetic Small Intestinal Scaffolds for Improved», *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 111, n. 6, pagg. 1222–1232, giu. 2014, doi: 10.1002/bit.25180.
- [61] C. M. Costello, R. M. Sorna, Y.-L. Goh, I. Cengic, N. K. Jain, e J. C. March, «3-D Intestinal Scaffolds for Evaluating the Therapeutic Potential of Probiotics», *Mol. Pharm.*, vol. 11, n. 7, pagg. 2030–2039, lug. 2014, doi: 10.1021/mp5001422.
- [62] S. Giusti *et al.*, «A novel dual-flow bioreactor simulates increased fluorescein permeability in epithelial tissue barriers», *Biotechnol. J.*, vol. 9, n. 9, pagg. 1175–1184, set. 2014, doi: 10.1002/biot.201400004.
- [63] C. M. Costello *et al.*, «Microscale Bioreactors for in situ characterization of GI epithelial cell physiology», *Sci. Rep.*, vol. 7, n. 1, pag. 12515, dic. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-12984-2.
- [64] J. Pusch *et al.*, «The physiological performance of a three-dimensional model that mimics the microenvironment of the small intestine», *Biomaterials*, vol. 32, n. 30, pagg. 7469–7478, ott. 2011, doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.06.035.
- [65] S. Giusti, D. Mazzei, L. Cacopardo, G. Mattei, C. Domenici, e A. Ahluwalia, «Environmental Control in Flow Bioreactors», *Processes*, vol. 5, n. 4, pag. 16, apr. 2017, doi: 10.3390/pr5020016.
- [66] K. Pocock *et al.*, «Intestine-on-a-Chip Microfluidic Model for Efficient in Vitro Screening of Oral Chemotherapeutic Uptake», *ACS Biomater. Sci. Eng.*, vol. 3, n. 6, pagg. 951–959, giu. 2017, doi: 10.1021/acsbomaterials.7b00023.
- [67] W. Shin *et al.*, «A Robust Longitudinal Co-culture of Obligate Anaerobic Gut Microbiome With Human Intestinal Epithelium in an Anoxic-Oxic Interface-on-a-Chip», *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 7, pag. 13, feb. 2019, doi: 10.3389/fbioe.2019.00013.
- [68] U. Marx *et al.*, «An Individual Patient’s “Body” on Chips—How Organismoid Theory Can Translate Into Your Personal Precision Therapy Approach», *Front. Med.*, vol. 8, pag. 728866, set. 2021, doi: 10.3389/fmed.2021.728866.
- [69] M. T. Raimondi, D. Albani, e C. Giordano, «An Organ-On-A-Chip Engineered Platform to Study the Microbiota–Gut–Brain Axis in Neurodegeneration», *Trends Mol. Med.*, vol. 25, n. 9, pagg. 737–740, set. 2019, doi: 10.1016/j.molmed.2019.07.006.

- [70] I. Raimondi, L. Izzo, M. Tunesi, M. Comar, D. Albani, e C. Giordano, «Organ-On-A-Chip in vitro Models of the Brain and the Blood-Brain Barrier and Their Value to Study the Microbiota-Gut-Brain Axis in Neurodegeneration», *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 7, pag. 435, gen. 2020, doi: 10.3389/fbioe.2019.00435.
- [71] C. D. Edington *et al.*, «Interconnected Microphysiological Systems for Quantitative Biology and Pharmacology Studies», *Sci. Rep.*, vol. 8, n. 1, pag. 4530, dic. 2018, doi: 10.1038/s41598-018-22749-0.
- [72] I. Maschmeyer *et al.*, «A four-organ-chip for interconnected long-term co-culture of human intestine, liver, skin and kidney equivalents», *Lab. Chip*, vol. 15, n. 12, pagg. 2688–2699, 2015, doi: 10.1039/C5LC00392J.
- [73] B. Cecen *et al.*, «Multi-Organs-on-Chips for Testing Small-Molecule Drugs: Challenges and Perspectives», *Pharmaceutics*, vol. 13, n. 10, pag. 1657, ott. 2021, doi: 10.3390/pharmaceutics13101657.
- [74] R. Novak *et al.*, «A robotic platform for fluidically-linked human body-on-chips experimentation», *Bioengineering*, preprint, mar. 2019. doi: 10.1101/569541.
- [75] A. Herland *et al.*, «Quantitative prediction of human pharmacokinetic responses to drugs via fluidically coupled vascularized organ chips», *Nat. Biomed. Eng.*, vol. 4, n. 4, pagg. 421–436, apr. 2020, doi: 10.1038/s41551-019-0498-9.
- [76] A. M. Marino, M. Yarde, H. Patel, S. Chong, e P. V. Balimane, «Validation of the 96 well Caco-2 cell culture model for high throughput permeability assessment of discovery compounds», *Int. J. Pharm.*, vol. 297, n. 1–2, pagg. 235–241, giu. 2005, doi: 10.1016/j.ijpharm.2005.03.008.
- [77] A. Garcia-Montero, S. Vasseur, G. V. Mallo, P. Soubeyran, J. C. Dagorn, e J. L. Iovanna, «Expression of the stress-induced p8 mRNA is transiently activated after culture medium change», *Eur. J. Cell Biol.*, vol. 80, n. 11, pagg. 720–725, nov. 2001, doi: 10.1078/0171-9335-00209.
- [78] K. A. Lentz, J. Hayashi, L. J. Lucisano, e J. E. Polli, «Development of a more rapid, reduced serum culture system for Caco-2 monolayers and application to the biopharmaceutics classification system», *Int. J. Pharm.*, vol. 200, n. 1, pagg. 41–51, apr. 2000, doi: 10.1016/S0378-5173(00)00334-3.
- [79] E. Sevin *et al.*, «Accelerated Caco-2 cell permeability model for drug discovery», *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, vol. 68, n. 3, pagg. 334–339, dic. 2013, doi: 10.1016/j.vascn.2013.07.004.
- [80] W. J. Woods, «Morphological Comparison of Caco-2 Cells in the Corning® BioCoat™ Intestinal Epithelial Cell Environment and the Traditional 21-day Caco-2 Culture System», pag. 4.
- [81] «Corning® BioCoat® HTS Caco-2 Assay System, PET Membrane | Corning». <https://ecatalog.corning.com/life-sciences/b2b/US/en/Permeable-Supports/HTS/Corning%C2%AE-BioCoat%C2%AE-HTS-Caco-2-Assay-System,-PET-Membrane/p/corningBioCoatHTSCaco2AssaySystemPETMembrane> (consultato 2 febbraio 2022).
- [82] Y. Cai *et al.*, «Development, validation, and application of a novel 7-day Caco-2 cell culture system», *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, vol. 70, n. 2, pagg. 175–181, set. 2014, doi: 10.1016/j.vascn.2014.07.001.
- [83] A. Salhotra, H. N. Shah, B. Levi, e M. T. Longaker, «Mechanisms of bone development and repair», *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 21, n. 11, pagg. 696–711, nov. 2020, doi: 10.1038/s41580-020-00279-w.
- [84] T. H. Ambrosi, M. T. Longaker, e C. K. F. Chan, «A Revised Perspective of Skeletal Stem Cell Biology», *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 7, pag. 189, set. 2019, doi: 10.3389/fcell.2019.00189.

- [85] C. Wittkowske, G. C. Reilly, D. Lacroix, e C. M. Perrault, «In Vitro Bone Cell Models: Impact of Fluid Shear Stress on Bone Formation», *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 4, nov. 2016, doi: 10.3389/fbioe.2016.00087.
- [86] G. Picone *et al.*, «Analysis of Intracellular Magnesium and Mineral Depositions during Osteogenic Commitment of 3D Cultured Saos2 Cells», *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, n. 7, pag. 2368, mar. 2020, doi: 10.3390/ijms21072368.
- [87] J. L. Pathak, N. Bravenboer, e J. Klein-Nulend, «The Osteocyte as the New Discovery of Therapeutic Options in Rare Bone Diseases», *Front. Endocrinol.*, vol. 11, pag. 405, lug. 2020, doi: 10.3389/fendo.2020.00405.
- [88] P. Su *et al.*, «Mesenchymal Stem Cell Migration during Bone Formation and Bone Diseases Therapy», *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, n. 8, pag. 2343, ago. 2018, doi: 10.3390/ijms19082343.
- [89] N. H. Hart, S. Nimphius, T. Rantalainen, A. Ireland, A. Siafarikas, e R. U. Newton, «Mechanical basis of bone strength: influence of bone material, bone structure and muscle action», pag. 26.
- [90] M. Herrmann *et al.*, «Interactions between Muscle and Bone—Where Physics Meets Biology», *Biomolecules*, vol. 10, n. 3, pag. 432, mar. 2020, doi: 10.3390/biom10030432.
- [91] P. Kazimierczak e A. Przekora, «Bioengineered Living Bone Grafts—A Concise Review on Bioreactors and Production Techniques In Vitro», *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 23, n. 3, pag. 1765, feb. 2022, doi: 10.3390/ijms23031765.
- [92] R. Nuti *et al.*, «Guidelines for the management of osteoporosis and fragility fractures», *Intern. Emerg. Med.*, vol. 14, n. 1, pagg. 85–102, 2019, doi: 10.1007/s11739-018-1874-2.
- [93] Y. Xie, L. Zhang, Q. Xiong, Y. Gao, W. Ge, e P. Tang, «Bench-to-bedside strategies for osteoporotic fracture: From osteoimmunology to mechanosensation», *Bone Res.*, vol. 7, pag. 25, ago. 2019, doi: 10.1038/s41413-019-0066-7.
- [94] K. L. Urish e J. E. Cassat, «Staphylococcus aureus Osteomyelitis: Bone, Bugs, and Surgery», *Infect. Immun.*, vol. 88, n. 7, pagg. e00932-19, giu. 2020, doi: 10.1128/IAI.00932-19.
- [95] S. Minisola, L. Colangelo, J. Pepe, D. Diacinti, C. Cipriani, e S. D. Rao, «Osteomalacia and Vitamin D Status: A Clinical Update 2020», *JBMR Plus*, vol. 5, n. 1, pag. e10447, dic. 2020, doi: 10.1002/jbm4.10447.
- [96] A. Forlino e J. C. Marini, «Osteogenesis imperfecta», *Lancet Lond. Engl.*, vol. 387, n. 10028, pagg. 1657–1671, apr. 2016, doi: 10.1016/S0140-6736(15)00728-X.
- [97] J. Mollentze, C. Durandt, e M. S. Pepper, «An In Vitro and In Vivo Comparison of Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stromal/Stem Cells», *Stem Cells Int.*, vol. 2021, pagg. 1–23, set. 2021, doi: 10.1155/2021/9919361.
- [98] M. Cortesi *et al.*, «Development of an electrical impedance tomography set-up for the quantification of mineralization in biopolymer scaffolds», *Physiol. Meas.*, vol. 42, n. 6, pag. 064001, giu. 2021, doi: 10.1088/1361-6579/ac023b.
- [99] M. C. Ciardulli *et al.*, «Tendon and Cytokine Marker Expression by Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in a Hyaluronate/Poly-Lactic-Co-Glycolic Acid (PLGA)/Fibrin Three-Dimensional (3D) Scaffold», *Cells*, vol. 9, n. 5, pag. 1268, mag. 2020, doi: 10.3390/cells9051268.
- [100] J. Lovecchio, V. Betti, M. Cortesi, E. Ravagli, S. Severi, e E. Giordano, «Design of a custom-made device for real-time optical measurement of differential mineral concentrations in three-dimensional scaffolds for bone tissue engineering», *R. Soc. Open Sci.*, vol. 9, n. 1, pag. 210791, gen. 2022, doi: 10.1098/rsos.210791.
- [101] H. Sudo, H. A. Kodama, Y. Amagai, S. Yamamoto, e S. Kasai, «In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria.», *J. Cell Biol.*, vol. 96, n. 1, pagg. 191–198, gen. 1983, doi: 10.1083/jcb.96.1.191.

- [102] J. Jin, R. T. Jaspers, G. Wu, J. A. M. Korfage, J. Klein-Nulend, e A. D. Bakker, «Shear Stress Modulates Osteoblast Cell and Nucleus Morphology and Volume», *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, n. 21, pag. 8361, nov. 2020, doi: 10.3390/ijms21218361.
- [103] J. Rungby, M. Kassem, E. F. Eriksen, e G. Danscher, «The von Kossa reaction for calcium deposits: silver lactate staining increases sensitivity and reduces background», *Histochem. J.*, vol. 25, n. 6, pagg. 446–451, giu. 1993, doi: 10.1007/BF00157809.
- [104] C. A. Gregory, W. Grady Gunn, A. Peister, e D. J. Prockop, «An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction», *Anal. Biochem.*, vol. 329, n. 1, pagg. 77–84, giu. 2004, doi: 10.1016/j.ab.2004.02.002.
- [105] H. Liu *et al.*, «Effects of Fiber Cross-Angle Structures on the Mechanical Property of 3D Printed Scaffolds and Performance of Seeded MC3T3-E1 Cells», *ACS Omega*, vol. 6, n. 49, pagg. 33665–33675, dic. 2021, doi: 10.1021/acsomega.1c04672.
- [106] D.-T. Chou, D. Wells, D. Hong, B. Lee, H. Kuhn, e P. N. Kumta, «Novel processing of iron–manganese alloy-based biomaterials by inkjet 3-D printing», *Acta Biomater.*, vol. 9, n. 10, pagg. 8593–8603, nov. 2013, doi: 10.1016/j.actbio.2013.04.016.
- [107] B. E. Grottkau, Z. Hui, Y. Yao, e Y. Pang, «Rapid Fabrication of Anatomically-Shaped Bone Scaffolds Using Indirect 3D Printing and Perfusion Techniques», *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, n. 1, pag. 315, gen. 2020, doi: 10.3390/ijms21010315.
- [108] A i M , «miRNA expression profile during fluid shear stress-induced osteogenic differentiation in MC3T3-E1 cells», pag. 7.
- [109] L. Yu *et al.*, «Fluid shear stress induces osteoblast differentiation and arrests the cell cycle at the G0 phase via the ERK1/2 pathway», *Mol. Med. Rep.*, vol. 16, n. 6, pagg. 8699–8708, dic. 2017, doi: 10.3892/mmr.2017.7720.
- [110] J. G. McGarry, J. Klein-Nulend, e P. J. Prendergast, «The effect of cytoskeletal disruption on pulsatile fluid flow-induced nitric oxide and prostaglandin E2 release in osteocytes and osteoblasts», *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 330, n. 1, pagg. 341–348, apr. 2005, doi: 10.1016/j.bbrc.2005.02.175.
- [111] A. M. Sailon, A. C. Allori, E. H. Davidson, D. D. Reformat, R. J. Allen, e S. M. Warren, «A Novel Flow-Perfusion Bioreactor Supports 3D Dynamic Cell Culture», *J. Biomed. Biotechnol.*, vol. 2009, pagg. 1–7, 2009, doi: 10.1155/2009/873816.
- [112] S. Sinlapabodin, P. Amornsudthiwat, S. Damrongsakkul, e S. Kanokpanont, «An axial distribution of seeding, proliferation, and osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells and rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells across a 3D Thai silk fibroin/gelatin/hydroxyapatite scaffold in a perfusion bioreactor», *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.*, vol. 58, pagg. 960–970, gen. 2016, doi: 10.1016/j.msec.2015.09.034.
- [113] H. Seddiqi *et al.*, «Inlet flow rate of perfusion bioreactors affects fluid flow dynamics, but not oxygen concentration in 3D-printed scaffolds for bone tissue engineering: Computational analysis and experimental validation», *Comput. Biol. Med.*, vol. 124, pag. 103826, set. 2020, doi: 10.1016/j.compbiomed.2020.103826.
- [114] A. F. Taylor, M. M. Saunders, D. L. Shingle, J. M. Cimbala, Z. Zhou, e H. J. Donahue, «Mechanically stimulated osteocytes regulate osteoblastic activity via gap junctions», *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.*, vol. 292, n. 1, pagg. C545–C552, gen. 2007, doi: 10.1152/ajpcell.00611.2005.
- [115] «Product Configuration WPM|WELCO». https://www.welco.net/product/wpm/wpm_guide.html (consultato 2 febbraio 2022).
- [116] «Form 3B+: Una stampante 3D desktop all'avanguardia progettata per il settore sanitario», *Formlabs*. <https://formlabs.com/it/3d-printers/form-3b/> (consultato 2 febbraio 2022).

- [117] «Materiali per la stampa 3D nel settore sanitario», *Formlabs*. <https://formlabs.com/it/industries/medical/materials/#biomed-clear-resin> (consultato 2 febbraio 2022).
- [118] «EasyDriver - Stepper Motor Driver - ROB-12779 - SparkFun Electronics». <https://www.sparkfun.com/products/12779> (consultato 2 febbraio 2022).
- [119] A. Pasini, J. Lovecchio, G. Ferretti, e E. Giordano, «Medium Perfusion Flow Improves Osteogenic Commitment of Human Stromal Cells», *Stem Cells Int.*, vol. 2019, pagg. 1–10, mag. 2019, doi: 10.1155/2019/1304194.
- [120] J. Lovecchio, P. Gargiulo, J. L. Vargas Luna, E. Giordano, e Ó. E. Sigurjónsson, «A standalone bioreactor system to deliver compressive load under perfusion flow to hBMSC-seeded 3D chitosan-graphene templates», *Sci. Rep.*, vol. 9, n. 1, pag. 16854, dic. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-53319-7.
- [121] A. Pasini *et al.*, «Perfusion Flow Enhances Viability and Migratory Phenotype in 3D-Cultured Breast Cancer Cells», *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 49, n. 9, pagg. 2103–2113, set. 2021, doi: 10.1007/s10439-021-02727-w.
- [122] «Quasi Vivo® | Commercially Available Organ-on-a-chip Technology», *Kirkstall Ltd.* <https://www.kirkstall.com/> (consultato 2 marzo 2022).