#### UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA



#### FACOLTA' DI INGEGNERIA

# Corso di Laurea Magistrale in Bioingegneria TESI DI LAUREA

# ELETTROPERMEABILIZZAZIONE DI CELLULE DI MAMMIFERO SU MICROCHIP MEDIANTE CORRENTI CAPACITIVE

RELATORE: Dr. Stefano Vassanelli

CORRELATORE: Dr. Stefano Girardi

LAUREANDO: Enrico Camatti

ANNO ACCADEMICO 2010-2011

## Indice

Sommario					
1	Introdu	zione	3		
	1.1 Cel	lula e membrana cellulare	3		
	1.2 Tra	nsfezione Cellulare	5		
	1.2.1	Transfezione farmacologica	6		
	1.2.2	Transfezione di acidi nucleici	6		
	1.2.3	Tecniche di transfezione di DNA	7		
	1.2	.3.1 Metodi biochimici	7		
	1.2	.3.2 Metodi virali	8		
	1.2	.3.3 Metodi fisici	9		
	1.3 Ele	ttroporazione	10		
	1.3.1	Cenni storici	11		
	1.3.2	Basi teoriche dell'elettroporazione	12		
	1.3.3	Elettroporazione in cuvetta	15		
	1.3.4	Elettroporazione su chip	16		
	1.3.5	Applicazioni attuali e future	17		
2	Modell	i e strumenti	19		
	2.1 Mc	dello di cellula su substrato di crescita	19		
	2.1.1	Modello a costanti distribuite	20		
	2.1.2	Modello a costanti concentrate	24		
	2.1.3	Modello a due domini di stimolazione	27		
	2.2 Dis	positivo elettronico utilizzato	31		
	2.3 Str	umentazione ausiliaria	33		
3	Materia	ali e metodi	35		
	3.1 Ma	teriali utilizzati	35		
	3.1.1	Linee cellulari	35		
	3.1.2	Soluzioni	37		

	3	3.1.3 Marcatori	.38		
	3.2	Metodi	.40		
	3	3.2.1 Forme d'onda per stimolazione	.40		
	3	3.2.2 Protocolli di elettroporazione	.41		
	3	3.2.3 Test di selettività	.42		
4 Risultati					
	4.1	Analisi della modificazione del segnale	.43		
	4.2	Ottimizzazione del protocollo di stimolazione	.44		
	4.3	Elettroporazione con Trypan Blue	.46		
	4.4	Elettroporazione con Falloidina	.48		
	4.5	Espressione della proteina fluorescente EYFP	.50		
	4.6	Confronto tra i risultati ottenuti	.52		
5	Co	nclusioni	.55		
Bibliografia					
R	Ringraziamenti61				

### Sommario

L'elettroporazione è un metodo fisico di transfezione che permette di rendere la membrana plasmatica cellulare temporaneamente e reversibilmente permeabile a molecole che naturalmente non sarebbero in grado di attraversare la membrana. Tale tecnica prevede l'esposizione delle cellule a brevi ed intensi impulsi elettrici che inducono un riarrangiamento dei fosfolipidi e la conseguente formazione di pori transitori sulla membrana cellulare. Una tecnologia innovativa è l'elettroporazione di cellule in adesione su chip: l'utilizzo di dispositivi bioelettronici di questo tipo permette l'adesione e il completamento del ciclo vitale delle cellule direttamente sulla superficie di stimolazione, consentendo un'elevata selettività di transfezione e un monitoraggio costante delle stesse. Numerosi sono i parametri da dover valutare per conseguire esiti positivi, tra cui il tipo di chip utilizzato e la forma d'onda del segnale di stimolazione.

Il lavoro svolto in questa tesi è focalizzato sulla ricerca di un protocollo di elettroporazione di cellule di mammifero in adesione su chip di silicio rivestiti di ossido di titanio; essendo la prima sperimentazione effettuata su tale tipologia di dispositivo elettronico, l'obbiettivo del lavoro è stato di valutare l'efficienza di transfezione di molecole di diversa natura mediante l'utilizzo di differenti impulsi di stimolazione.

Nel **primo capitolo** sono presentate le diverse tecniche di transfezione cellulare, fisiche, chimiche e virali.

Nel **secondo capitolo** sono delucidati i modelli in grado di fornire una descrizione elettrica del sistema fisico composto da una cellula in adesione su un substrato di coltura, il dispositivo utilizzato, le sue principali caratteristiche e la strumentazione utilizzata per la visualizzazione dell'esito delle sperimentazioni.

Nel **terzo capitolo** sono esposti i diversi materiali utilizzati durante lo sviluppo del progetto, le metodologie di lavoro seguite, le linee cellulari, le soluzioni, i marcatori utilizzati per la valutazione dell'effettiva elettroporazione, le forme d'onda di stimolazione ed i protocolli di elettroporazione.

Nel **quarto capitolo** sono presentati i risultati ottenuti durante la sperimentazione tramite l'utilizzo di differenti marcatori e impulsi di stimolazione.

Nel **quinto capitolo** si analizzano i dati ottenuti dagli esperimenti svolti e si identificano i possibili futuri sviluppi di tale tipo di elettroporazione su chip.

## 1 Introduzione

#### 1.1 Cellula e membrana cellulare

La cellula può essere definita come l'unità morfologica e funzionale fondamentale degli esseri viventi dei quali possiede tutte le proprietà tra cui la riproduzione, la respirazione e la capacità di sintesi. Essa è in grado di modificare la propria forma in base alla funzione che deve svolgere e di reagire ai diversi stimoli esterni. Possono essere distinti due tipi principali di cellule, procariote ed eucariote: mentre nel primo tipo non è presente una membrana in grado di isolare al suo interno il materiale genetico, nel secondo il nucleo separa il materiale genetico dalle altre strutture intracellulari. Le cellula eucariote è, quindi, composta da tre componenti fondamentali: la membrana plasmatica, il nucleo e il citoplasma.

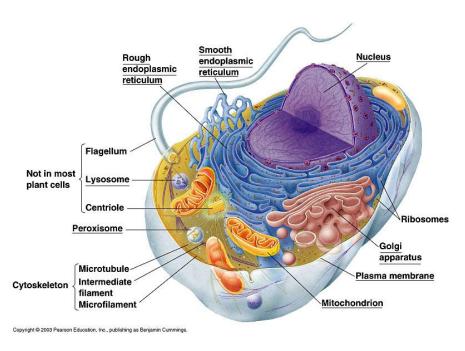


Figura 1.1 Rappresentazione di una cellula animale (Mr. Donnelly. Animal cell. http://millville.sps.edu/allaccess/divisions/science/jdonnelly/Cell%20Page.htm)

Il citoplasma è formato da una soluzione acquosa ricca di proteine, il citosol, e all'interno di esso sono presenti gli organuli che sono inclusi in una matrice definita citoscheletro. Esso svolge importanti funzioni per la cellula e gli organuli, quali la definizione della forma della cellula e il trasporto intracellulare degli organuli, ed inoltre fornisce resistenza meccanica. E' formato da tre differenti tipi di fibre di diverse dimensioni: microtubuli, filamenti intermedi e microfilamenti: tra quest'ultimi l'actina filamentosa svolge un ruolo preponderante nel conferimento di stabilità strutturale alla cellula e nella modulazione e controllo dei movimenti cellulari.

Il nucleo è una struttura contenente il materiale genetico. Esso racchiude gli acidi nucleici, i quali sono superavvolti in strutture dette cromosomi, che, in seguito a duplicazione, vengono ereditati dalle cellule durante la divisione. Il nucleo è circondato da una membrana costituita da un doppio strato fosfolipidico, denominata involucro nucleare: essa, mediante pori nucleari, è permeabile a piccole molecole e ioni in modo da consentire la comunicazione tra l'interno del nucleo e il citoplasma permettendo il passaggio di proteine ed mRNA. Esso è considerato la centrale di controllo della cellula in quanto gestisce le attività cellulari e la produzione delle proteine. La sintesi proteica è il processo attraverso il quale l'informazione contenuta nei geni viene tradotta in proteine: inizia nel nucleo con il processo di sintesi della molecola di RNA (trascrizione) in seguito al quale si ha la formazione di una singola catena di nucleotidi denominata RNA messaggero (mRNA). Tale molecola ha la capacità di attraversare la membrana nucleare tramite i pori in essa presente e, una volta nel citoplasma, servire da stampo nel complesso processo della traduzione proteica (traduzione), durante il quale sono coinvolti componenti diversi, tra cui ribosomi e gli RNA di trasferimento (tRNA).

La membrana cellulare o plasmatica ha uno spessore di circa 5-8 nm, è costituita da differenti proteine e lipidi ed è semipermeabile. La presenza di canali ionici e proteine trasportatrici consente di variare la permeabilità specifica della cellula in base alle quantità di sostanze richieste. I principali lipidi che la compongono sono i fosfolipidi formati da una testa idrofilica o polare ed una doppia coda idrofobica o non polare; essi formano un doppio strato nel quale le estremità idrofiliche sono a contatto con il liquido extracellulare e con il citoplasma acquoso, mentre le estremità idrofobiche sono dirette verso l'interno della membrana.

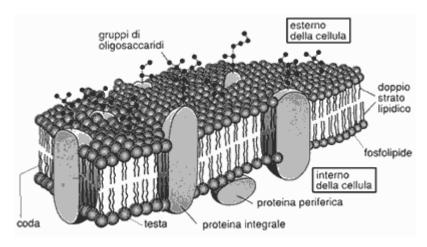


Figura 1.2 Rappresentazione della membrana plasmatica. (www.sapere.it)

Differenti tipi di proteine sono presenti all'interno della membrana, alcune attraversano l'intera membrana (proteine integrali), mentre altre sono attaccate alla superficie interna o esterna della membrana (proteine periferiche).

Le più importanti funzioni della membrana plasmatica possono essere sintetizzate in cinque punti fondamentali:

- Conservazione della integrità strutturale della cellula;
- Regolazione delle molecole che entrano ed escono dalla cellula;
- Riconoscimento tra le cellule;
- Comunicazione tra le cellule;
- Adesione tra le cellule per la formazione di tessuti ed organi.

#### 1.2 Transfezione Cellulare

Come precedentemente accennato, la membrana plasmatica cellulare è in grado di selezionare, tramite il processo di diffusione, i soluti che possono transitare dall'ambiente cellulare a quello extracellulare e viceversa. Processi di trasporto come quello di endocitosi ed esocitosi permettono alla cellula di comunicare e regolare lo scambio di sostanze che consentono il mantenimento delle condizioni chimico-fisiche interne alla cellula al variare delle condizioni esterne.

E' possibile tramite processi artificiali introdurre all'interno della cellula materiale biologico esogeno per verificarne l'influenza a livello cellulare: tali sostanze possono essere, ad esempio, farmaci al fine di studiarne gli effetti o acidi nucleici per inibire o favorire l'espressione di un determinato gene.

#### 1.2.1 Transfezione farmacologica

In ambito farmacologico lo studio degli effetti di un nuovo farmaco a livello cellulare presenta spesso grandi difficoltà dovute alla permeabilità della molecola alle diverse membrane cellulari durante modalità di somministrazione non endovenosa. La transfezione è una tecnica che quindi permette di introdurre farmaci in forma ionizzata e pertanto è largamente utilizzata in diversi studi farmacologici. L'introduzione di antibiotici, ad esempio, all'interno della cellula può essere in molti casi difficoltosa poiché, in ambiente acquoso, essi sono presenti in forma polarizzata; la loro bassa solubilità unita all'elevata resistenza elettrica dovuta alle cariche della molecola stessa e ai gruppi polari presenti sulla superficie della membrana impediscono un normale processo di trasporto all'interno della cellula.

#### 1.2.2 Transfezione di acidi nucleici

In biologia cellulare la transfezione è utilizzata per l'introduzione di acidi nucleici nelle cellule eucariotiche. Tramite questa tecnica è possibile studiare la specifica funzione di un determinato gene. Due sono i principali procedimenti che permettono l'inibizione o l'induzione dell'espressione di tali gene: nel primo viene introdotto nella cellula un segmento di DNA che ne induce l'espressione permettendo di valutare modificazioni dello stato fisiopatologico o morfologico della cellula. Nel secondo modo, definito "silenziamento genico", si altera permanentemente o transitoriamente l'espressione di un gene. Quando l'alterazione è permanente si parla di *knock out*, in cui si priva la cellula del gene in esame con conseguente mancata produzione della proteina ad esso associata, mentre quando la modificazione è temporanea, si agisce sulle molecole di mRNA utilizzando la tecnica dell' *RNA interference* (RNAi). Durante tale meccanismo si

introducono nella cellula specifici filamenti corti di RNA interferanti, siRNA (*short interfering* RNA), che individuano lo specifico mRNA e ne avviano la degradazione enzimatica. Questa seconda alterazione viene definita *knock down* e comporta una riduzione della produzione della proteina associata a tale gene dell' 80-90% rispetto ai livelli normali. L'utilizzo di tali tecniche permette quindi lo studio dell'influenza e della funzione di specifici geni legati a malattie ereditarie nella cellula, permettendo in futuro di curare malattie di tipo ereditario e di produrre proteine di diversa natura in grandi quantità per scopi terapeutici.

#### 1.2.3 Tecniche di transfezione di DNA

Le tecniche di transfezione del DNA posso essere classificate in tre principali categorie:

- Metodi biochimici;
- Metodi virali;
- Metodi fisici.

#### 1.2.3.1 Metodi biochimici

Questa tipologia di metodi si basa sull'utilizzo di molecole vettrici cariche positivamente che in soluzione si legano ai gruppi fosfato delle catene di DNA cariche negativamente; questo permette ai composti di superare la barriera elettrica della membrana cellulare e di essere assorbiti in seguito dalla cellula. (Gao et al. 2007)

Differenti molecole possono essere utilizzate per la formazione di tali composti:

■ CaCl₂: in tale tecnica detta "calcio-fosfato", il calcio si lega ai gruppi fosfato del DNA formando una molecola insolubile che aderisce alla superficie della cellula e viene in seguito assorbita tramite il processo di endocitosi. E' una tecnica che prevede un facile protocollo di utilizzo, bassi costi dei componenti ed è applicabile a diverse linee cellulari: tali caratteristiche determinano un suo ampio utilizzo.

- **DEAE-dextran**: si tratta di un polimero cationico in grado di legarsi ai gruppi fosfato del DNA. Il composto formato si deposita sulla membrana e viene assorbito presumibilmente per endocitosi. Essendo tale polimero tossico per le cellule, il protocollo di utilizzo deve essere ottimizzato in modo tale da limitare i tempi di esposizione per le cellule.
- Liposomi cationici: si tratta in questo caso di vescicole sintetiche cariche positivamente che si legano al DNA in soluzione. Il complesso che si viene a formare viene poi assorbito dalla cellula per endocitosi o per fusione con la membrana. I vantaggi principali di tale tecnica sono l'elevata efficienza di trasferimento genico e la possibilità di transfettare quelle linee cellulari che risultano resistenti al CaCl₂ e al DEAE-dextran senza limiti di esposizione alla cellula.

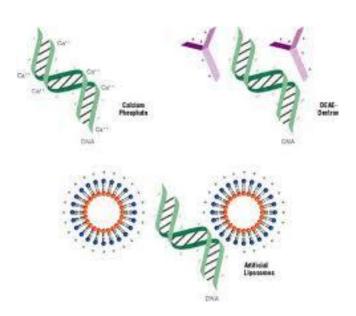


Figura 1.3 Rappresentazione schematica dei tre diversi metodi biochimici. (http://users.unimi.it.htm)

#### 1.2.3.2 Metodi virali

Tali metodi prevedono l'inserimento di un frammento di DNA contenente il gene da transfettare in un virus-vettore geneticamente modificato in modo da non essere infettivo; questo virus è poi in grado di introdursi nella cellula ed iniettare il DNA nel nucleo. L'uso di virus-vettori per mediare la trasfezione di DNA presenta una elevata efficienza e la possibilità di espressione genica per un lungo periodo, ma presenta problemi legati alla risposta immunitaria acuta e all'immunogenicità.

Per tali tecniche è possibile l'uso di retrovirus o di adenovirus: nel primo caso i virus presentano materiale genetico a RNA e risultano efficaci prevalentemente in cellule in fase di mitosi. Per tale motivo sono sconsigliati per linee cellulari come neuroni o epatociti. Nel secondo caso i virus sono caratterizzati da un doppio filamento di DNA, agiscono anche su cellule non in fase di mitosi, ma possono innescare una reazione da parte del sistema immunitario del sistema ricevente ed essere distrutti.

#### 1.2.3.3 Metodi fisici

I metodi fisici di trasfezione prevedono l'iniezione diretta della molecola all'interno della cellula e sono pertanto tecniche invasive. Si ovviano in questo modo ostacoli presenti nell'introduzione degli acidi nucleici tramite passaggio attraverso la membrana cellulare. Sono metodi che provocano danni temporanei o difetti nella membrana cellulare permettendo al DNA di entrare tramite diffusione.

I cinque metodi fisici maggiormente diffusi sono:

- **Microiniezione:** prevede l'iniezione degli acidi nucleici tramite un sottile capillare (ago). E' una tecnica efficace, priva di tossicità, ma non applicabile su un ampio numero di cellule in quanto costosa e laboriosa.
- Gene Gun: tecnica nota anche come bombardamento di particelle, prevede l'utilizzo di piccole particelle d'oro ricoperte di DNA come microproiettili accelerati con gas pressurizzati e introdotte nelle cellule. Si tratta di un sistema molto costoso ed è quindi utilizzato per cellule difficilmente transfettabili con le altre tecniche.

- **Sonoporazione:** l'applicazione di onde sonore a differenti frequenze provoca la formazione delle cosiddette *ultrasound-mediated acoustic cavitations*, ovvero una permeabilizzazione transitoria della membrana, che permettono l'ingresso di molecole esogene all'interno della cellula.
- Optoporazione: tale metodo prevede l'utilizzo di impulsi laser ad alta intensità in grado di modificare temporaneamente la membrana cellulare con la formazione di pori. Numerosi esperimenti hanno mostrato l'utilizzabilità di tale tecnica a tutti i tipi di cellule.
- Elettroporazione: è una tecnica di trasfezione molto versatile che è stata largamente testata con differenti tipi di cellule. Utilizza brevi ed intensi impulsi elettrici per formare pori transitori sulla membrana cellulare. Tale tecnica sarà approfondita nel paragrafo successivo.

#### 1.3 Elettroporazione

L'elettroporazione è un metodo biofisico per la permeabilizzazione temporanea della membrana cellulare: tale tecnica prevede l'utilizzo di brevi ed intensi impulsi ad alto voltaggio al fine di rendere possibile l'ingresso all'interno della cellula di molecole che altrimenti sarebbero impermeabili. Tale tecnica consente quindi l'inserimento di materiale esogeno all'interno della cellula senza provocare il danneggiamento della cellula dovuto a perforazioni talvolta critiche.

L'applicazione di un campo elettrico esterno durante il processo di elettroporazione tale da poter superare la capacità della membrana cellulare, permette un temporaneo rilassamento della struttura della stessa e la formazione di pori transitori e reversibili. Durante questa fase transitoria molecole di piccole dimensioni possono essere introdotte nella cellula per diffusione o mediante processo guidato elettroforicamente permettendo l'ingresso attraverso la membrana destabilizzata.

L'elettroporazione è una tecnica nata per la transfezione di geni ma è risultata essere efficiente ed in seguito largamente utilizzata per il trasporto di differenti

tipi di molecole quali coloranti, farmaci, marcatori e acidi nucleici (*Gehl 2003*). Essa è utilizzata con successo in sperimentazioni sia *in vitro* che *in vivo* per differenti tipi di cellule; fondamentale risulta essere al fine di ottenere buoni risultati l'ottimizzazione dei parametri utilizzati durante il processo. Il tipo di forma d'onda utilizzato, la durata degli impulsi e le soluzioni utilizzate come mezzo conduttivo nel sistema rappresentano solo alcune delle variabili da tenere in considerazione durante gli esperimenti.

#### 1.3.1 Cenni storici

I primi studi ed esperimenti effettuati con l'utilizzo dell'elettroporazione risalgono agli anni sessanta e settanta, ma la prima pubblicazione su una transfezione genica avvenne nel 1982, redatta dai ricercatori Neumann *et al.* Tale ricerca utilizzava cellule murine e la camera di elettroporazione era stata realizzata dagli stessi realizzatori dello studio. In seguito a tale ricerca numerosi esperimenti furono svolti per l'analisi della transfezione di DNA su batteri.

Durante gli anni ottanta differenti esperimenti *in vitro* furono effettuati per la transfezione di molecole all'interno di cellule eucariotiche (*Melvik et al. 1986*, *Mir et al. 1988*), mentre già a partire degli anni novanta furono condotti studi *in vivo* (*Mire t al. 1991*, *Salford et al. 1993*, *Heller et al 1995*).

Belehradek et al. nel 1993 furono i primi ad applicare la tecnica dell'elettroporazione in uno studio clinico al fine di migliorare l'assorbimento dei farmaci chemioterapici nei tumori; numerosi furono gli studi che seguirono questo obiettivo negli anni successivi (*Heller et al. 1998, Mir et al. 1998, Gehl & Geertsen 2000, Sersa et al. 2000*).

Negli ultimi decenni importanti innovazioni nella strumentazione per l'elettroporazione sono state realizzate: la costruzione di nuovi generatori di forma d'onda ha permesso negli ultimi anni di poter controllare e modificare parametri come forma, intensità e durata dell'impulso per definire efficienti protocolli per l'ottenimento di migliori risultati. Diverse sono quindi le strade intraprese dalla ricerca in tale ambito sia con sperimentazioni *in vivo* che *in vitro*, con l'obiettivo comune di ottimizzare l'efficienza di transfezione cercando di conservare la vitalità della cellula.

#### 1.3.2 Basi teoriche dell'elettroporazione

Come precedentemente descritto, l'applicazione di un campo elettrico ed il successivo superamento del potenziale di transmembrana della tensione di rottura dielettrica genera un riarrangiamento delle catene lipidiche e la formazione di micropori. Tale potenziale di transmembrana può essere descritto dalla seguente equazione:

$$\Delta V_M = f E_{ext} r cos \theta \tag{1}$$

Dove:

- $V_M$  è il potenziale di transmembrana;
- *f* è un fattore che descrive l'impatto della cellula sulla distribuzione del campo extracellulare;
- $E_{ext}$  è il campo elettrico applicato;
- r è il raggio della cellula;
- $\theta$  è l'angolo polare rispetto al campo elettrico esterno.

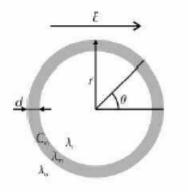


Figura 1.4 Modellizzazione sferica della cellula. In figura sono riportati i parametri presenti all'equazione 1, la conduttività  $\lambda$  delle diverse sezioni e la capacità di membrana  $C_m$  (Miklavic et al. 2006)

Nel momento in cui il potenziale di transmembrana  $\Delta V_M$  imposto supera il livello di soglia  $\Delta V_S$ , si ottiene la formazione di micropori sulla membrana cellulare. Tale valore di soglia risulta simile per i diversi tipi di cellule eucariotiche ed è di circa 1 V (*Kinosita & Rols 1993*).

Dall'equazione (1) è facilmente intuibile che minore è il raggio della cellula, maggiore è l'intensità del campo elettrico necessario per ottenere l'elettroporazione: pertanto tale tecnica prevede, per esempio, l'utilizzo di un campo ad intensità inferiore quando sono utilizzate cellule di mammifero rispetto a quando sono utilizzati batteri. E' inoltre deducibile che gli organelli intracellulari, come ad esempio i mitocondri, non verranno elettroporati, in quanto l'intensità del campo elettrico applicato risulta essere insufficiente.

L'utilizzo di impulsi molto brevi, dell'ordine dei nanosecondi, ad elevata intensità provoca la permeabilizzazione degli organelli intracellulari senza indurre l'elettroporazione della membrana cellulare: questo avviene perché la breve durata dell'impulso non permette di raggiungere il tempo di carica della membrana cellulare (Schoenbach et al. 2001).

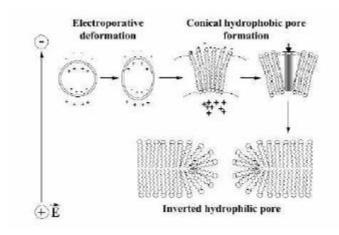


Figura 1.5 Rappresentazione del modello di Neumann per la descrizione della formazione di pori nella membrana (*Somiari et al. 2000*).

Come è possibile vedere dal modello di Neumann esposto in figura, durante la fase iniziale del processo di elettroporazione, gli ioni e le molecole dipolari presenti all'interno della cellula si orientano in base alla direzione del campo elettrico applicato; tale movimento delle molecole provoca un accumulo di cariche positive da un lato e negative da quello opposto, determinando una

elongazione della cellula fino a conferirle una forma ellittica. Questo processo di elongazione determina una riduzione del raggio di curvatura della membrana nelle zone perpendicolari al campo, determinando un riarrangiamento dei lipidi e la conseguente formazione di pori idrofobici conici. La costante applicazione del campo elettrico comporta un'ulteriore modificazione della struttura dei lipidi, fino a formare pori idrofilici invertiti che consentono il flusso sia di molecole di piccole dimensioni come gli ioni che di polinucleotidi. (*Chernomordik et al. 1992*). Nello studio di *Davalos et al. del 2000* è esposto come sia possibile misurare la dimensione dei pori generati dal campo elettrico per via indiretta: introducendo nella cellula molecole di differenti dimensioni note, si è in grado di stimare l'effettiva grandezza dei pori.

L'assorbimento all'interno della cellula di piccole molecole avviene per sola diffusione indipendentemente dalla carica (*Neumann et al. 1998*), mentre all'aumentare della grandezza tale processo può subire delle limitazioni; differenti studi hanno mostrato che molecole di grandezza comparabile a quella degli anticorpi posso essere introdotte all'interno della cellula tramite elettroporazione (*Glogauer & McCulloch 1992, Verspohl et al. 1997*). Studi *in vitro* ed *in vivo* (*Golzio et al. 1998, Mir et al. 1999*) hanno mostrato che l'assorbimento di DNA tramite elettroporazione non avviene mediante diffusione, ma grazie alla presenza di forze elettroforetiche (*Sukharev et al. 1992*). In seguito alla permeabilizzazione della membrana, tali forze sono in grado di muovere il DNA consentendone l'ingresso nel citosol della cellula durante gli impulsi successivi (*Gehl et al 1999*).

La formazione di micropori sulla membrana cellulare durante il processo di elettroporazione avviene in un arco di tempo dell'ordine dei microsecondi; la loro chiusura, invece, può durare anche alcuni minuti. E' stato dimostrato che fattori quali temperatura, parametri del campo elettrico applicato e condizione del citoscheletro della cellula possono influenzare in maniera significativa i tempi di chiusura dei micropori formati (*Teissie & Roland 1994*).

L'applicazione di campi elettrici troppo intensi può provocare l'irreversibilità del riarrangiamento dei lipidi di membrana, con la possibilità di perdita di organelli intracellulari in ambiente extracellulare. Comparando studi di elettroporazione svolti *in vitro* e *in vivo* è possibile evidenziare una quantità più consistente di cellule morte nel primo caso rispetto al secondo: questo sembra dovuto al fatto che nei tessuti le cellule hanno un minore spazio extracellulare e questo previene, in parte, la fuoriuscita di organelli intracellulari dalla cellula (*Gehl et al 1999*).

Tali considerazioni mostrano l'importanza di riuscire a determinare il migliore protocollo di elettroporazione per ciascun tipo di cellula, modificando e controllando i parametri coinvolti in tale processo al fine della sopravvivenza della cellula in seguito allo stimolo.

#### 1.3.3 Elettroporazione in cuvetta

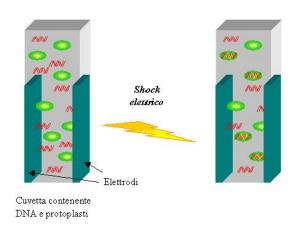


Figura 1.6 Schematizzazione del processo di elettroporazione in cuvetta (www.apat.gov.it)

Tale tecnica di elettroporazione prevede l'utilizzo di un sistema molto semplice composto da una cuvetta contenente in sospensione le cellule e le molecole da introdurre e da due elettrodi connessi ad essa. Il campo elettrico generato tra i due elettrodi ha una distribuzione pressoché uniforme (*Gehl et al. 2002*) e determina il riarrangiamento delle catene lipidiche. Tale modificazione porta alla formazione di micropori che consentono l'ingresso alle molecole esogene poste in sospensione. Nonostante questa tecnica offra una buona efficienza di transfezione, diversi sono gli svantaggi che sorgono nel suo utilizzo: le quantità di cellule e molecole esogene sono elevate e comportano uno spreco di materiale talvolta costoso; mancata selettività delle cellule; l'indice di mortalità cellulare risulta abbastanza elevato.

Uno dei materiali comunemente utilizzati per dispositivi a cuvetta è l'alluminio: lo svantaggio principale dell'utilizzo di tale materiale è il rilascio di ioni Al<sup>3+</sup> da

parte dell'elettrodo d'alluminio che è stato dimostrato avere effetti avversi nei confronti delle cellule. L'utilizzo di materiali come oro o platino è molto più vantaggioso, ma risulta essere molto costoso (*Shin et al. 2004*).

Diversi studi hanno mostrato che le cellule possono subire in questo sistema un elevato stress termico: il calore generato dagli impulsi di tensione viene dissipato lentamente a causa di un basso rapporto superficie-volume e può comportare danni irreversibili alle cellule (*Shin et al. 2004*).

E' inoltre importante sottolineare che durante il processo di elettroporazione in cuvetta si viene a creare uno strato a due fasi in prossimità degli elettrodi: una liquida e una gassosa. Bolle vengono generate elettrochimicamente molto velocemente e determinano un moto del liquido presente. La combinazione del movimento delle bolle al fenomeno di elettroforesi durante l'impulso determina una condizione di disomogeneità della sospensione (*Shin et al. 2004*).

#### 1.3.4 Elettroporazione su chip

Tale tecnica, definita anche elettroporazione di cellule in coltura, consiste nella stimolazione delle cellule presenti in adesione direttamente su dispositivo elettronico. Le cellule vengono, infatti, seminate direttamente sul sistema elettronico in grado di trasmettere l'impulso elettrico, superando in questo modo numerosi degli svantaggi riscontrati nell'uso della precedente tecnica.

L'utilizzo di tale metodologia permette di ridurre al minimo gli sprechi di materiale quali cellule, molecole esogene e mezzo di coltura; il costante sviluppo di nuovi dispositivi elettronici ha permesso di utilizzare impulsi con un voltaggio molto basso (3-5 V) che permette di ridurre il danno alla cellula al quale si può incorrere nel caso dell'utilizzo della cuvetta. Anche la mortalità cellulare in questo caso è inferiore rispetto a quella presente nella precedente tecnica (*Shin et al. 2004*).

Uno dei più significativi vantaggi presenti nell'utilizzo di questa tecnica è la possibilità di selezionare le cellule che si intendono elettroporare: l'utilizzo di chip con differenti aree di stimolazione, l'una indipendente dall'altra, consente di attuare una transfezione altamente selettiva. Tale tecnologia permette di effettuare studi su una stessa coltura cellulare nello stesso momento utilizzando

differenti parametri di elettroporazione sulle diverse aree di stimolazione presenti sul chip (*Vassanelli et al. 2008*).

#### 1.3.5 Applicazioni attuali e future

L'elettroporazione rappresenta un'importante tecnica per la transfezione di molecole esogene: si tratta di un metodo fisico che può essere utilizzato per l'introduzione non virale di geni all'interno di una cellula e rappresenta una valida alternativa all'utilizzo di vettori virali. In seguito alle prime sperimentazioni condotte da Neumann e colleghi nel 1982, l'elettroporazione è divenuta una tecnica largamente applicata sia per cellule procariote che eucariote (*Wells* 2009).

Una grande varietà di elettrodi è stata sviluppata negli ultimi anni e la scelta dell'uno o dell'altro dipende essenzialmente dal tipo di tessuto che deve essere trattato: si possono trovare elettrodi invasivi ad ago, cateteri per elettroporazione per i vasi sanguigni ed elettrodi superficiali non invasivi (*Wells 2009*).



Figura 1.7 Alcuni esempi di chip piatti e ad ago (*Gehl et al. 2002*)

L'elettroporazione può essere utilizzata *in vitro* per introdurre nella cellula differente materiale genetico, quale DNA, RNA e oligonucleotidi. *In vivo* è risultata essere efficace per differenti tipi di tessuto, quali tumori, pelle, fegato, polmoni e reni tra gli altri. E' stata inoltre utilizzata per la transfezione di RNA,

DNA e oligonucleotidi e come primaria vaccinazione per migliorare la risposta immunitaria mediata dalla cellula (*Wells 2009*).

Un'altra importante applicazione di questa tecnica avviene nel rilascio di farmaci chemioterapici in pazienti affetti da cancro. L'introduzione di tali farmaci direttamente nella cellula è in grado di aumentare notevolmente il livello di citotossicità la selettività delle cellule tumorali (Gehl 2004). L'elettrochemioterapia ha mostrato un'elevata efficienza in differenti tipi di tumore, tra cui adenocarcinoma (Mir et al. 1998), carcinoma delle cellule renali (Sersa et al. 2000) e melanoma maligno (Gehl & Geertsen 2000, Sersa et al. 2000). Fattore limitativo dell'elettrochemioterapia è tuttavia l'anatomia dell'area da trattare, in quanto talvolta difficilmente raggiungibile per il posizionamento degli elettrodi (Gehl 2004).

Applicazioni future dell'elettroporazione sono la transfezione di molecole come ioni,farmaci, DNA, proteine, oligonucleotidi direttamente nel citosol della cellula in vitro, in vivo e nei pazienti (Gehl 2004). L'applicazione dell'elettroporazione in vivo sui tessuti rappresenta una delle sfide della ricerca futura: difficoltà nascono, in questo caso, dalla comprensione di come poter trattare un intero tessuto avente proprietà e caratteristiche molto diverse al suo interno. Future applicazioni potrebbero riguardare lo sviluppo di cure a livello genetico di malattie umane e l'evoluzione di cure contro il cancro specifiche per ciascun individuo che possano essere controllate a tempo reale tramite dispositivo elettronico (Davalos et al. 2000).

## 2 Modelli e strumenti

In questo capitolo sono descritti i diversi modelli sviluppati per lo studio dei processi che coinvolgono la cellula durante le tecniche di stimolazione. Sono inoltre descritti il dispositivo utilizzato durante la sperimentazione e la strumentazione impiegata per la visualizzazione delle cellule in adesione sui chip.

#### 2.1 Modello di cellula su substrato di crescita

Il modello che si prende in esame in questo paragrafo considera la presenza di un sottile strato, denominato *cleft*, che separa la membrana cellulare dalla superficie di adesione, che in questo caso consiste nell'ossido di titanio (TiO<sub>2</sub>). Tale strato di separazione si forma in seguito alle interazioni tra le proteine sporgenti dalla membrana plasmatica e le molecole di adesione della cellula (*Cell Adhesion Molecule*) e della matrice extracellulare secrete dalla cellula e depositate sulla superficie di adesione. Nel *cleft* è presente una soluzione extracellulare con proprietà di un mezzo conduttore.

Il sistema può essere descritto tramite due condensatori ideali: l'uno costituito dal doppio strato fosfolipidico che compone la membrana cellulare, mentre l'altro formato dal substrato di adesione. La soluzione presente nella area di *cleft* determina un'elevata resistenza elettrica che isola la zona centrale di contatto dalla periferia della zona di adesione che viene posta a massa. L'applicazione di una corrente di cariche implica una caduta di potenziale  $V_J(x,t)$  tra le due aree sopra citate: l'ampiezza di tale grandezza lungo la giunzione J (junction) varia al variare della posizione x e del tempo t.

Il modello a costanti distribuite o a contatto esteso/superficiale è un modello biofisico che permette la descrizione del contatto di adesione; in tale modello un'equazione differenziale permette di determinare l'andamento del potenziale extracellulare  $V_J$  in funzione delle variabili in gioco e dei parametri del sistema.

Tuttavia la complessità matematica di tale modello limita il suo utilizzo ad uno scarso numero di processi di sperimentazione.

Per questo motivo è utile descrivere il sistema insieme ad un altro modello definito a costanti concentrate o a contatto puntuale. Esso rappresenta una semplificazione del modello precedentemente citato, in quanto prevede l'approssimazione della superficie di adesione ad un solo punto di contatto al quale è applicata la legge di Kirckhoff. La precedente equazione differenziale viene, in questo caso, sostituita da un'equazione algebrica nella quale scompare la dipendenza dalla posizione lungo la superficie di contatto, mentre si conserva quella dal tempo.

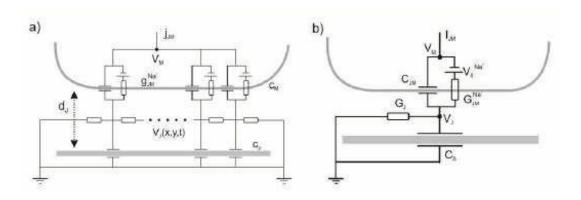


Figura 2.1 a) Modello a costanti distribuite; b) Modello a costanti concentrate.

#### 2.1.1 Modello a costanti distribuite

Il primo passo per un'analisi a costanti distribuite è la definizione e la caratterizzazione con specifici parametri di un dominio minimo  $\Delta x$  che rappresenta in termini spaziali un'unità elementare del sistema. Un sistema completo di equazioni tramite le quali è possibile descriverne tensione e corrente è ottenibile analizzando due nodi contigui di questa maglia elementare.

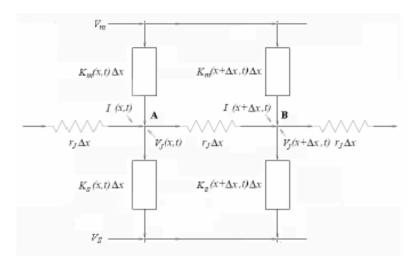


Figura 2.2 Cella elementare del contatto di adesione.

Si considera quindi un  $\Delta x$  della zona di contatto di adesione tra i due nodi A e B e si definiscono i seguenti parametri:

- r<sub>J</sub> la resistenza ohmica fornita dal mezzo extracellulare presente tra membrana plasmatica e superficie di adesione;
- K<sub>M</sub>(x,t) la densità di corrente: esso è formato dai contributi di corrente per unità di lunghezza dovuti alle proprietà capacitive e conduttive della membrana cellulare;
- Ks(x,t) la densità di corrente che descrive il contributo di corrente capacitiva per unità di lunghezza derivante dal substrato isolante di adesione;
- I(x,t) e I(x+ Δx,t) le correnti in ingresso e le correnti in uscita dal nodo A della maglia elementare;
- $V_J(x,t)$  e  $V_J(x+\Delta x,t)$  i potenziali extracellulari presenti rispettivamente al nodo A e al nodo B;
- $lackbox{ } lackbox{ } lac$
- V<sub>s</sub> il potenziale della regione interna del substrato di adesione a comportamento uniforme.

Considerando il bilanciamento delle correnti extracellulari entranti e uscenti dal nodo A e la caduta di tensione sul ramo AB si ricava:

$$I(x,t) + K_M(x,t)\Delta x = I(x + \Delta x,t) + K_S(x,t)\Delta x \tag{1}$$

$$V_I(x,t) - V_I(x + \Delta x, t) = r_I \Delta x I(x + \Delta x, t)$$
 (2)

Tali equazioni possono essere considerate in un sistema di equazioni lineari accoppiate per la corrente ed il potenziale extracellulare espresso in funzione dell'incremento spaziale  $\Delta x$ .

Passando al limite per incrementi infinitesimali:

$$\frac{\partial I(x,t)}{\partial x} = K_M(x,t) - K_S(x,t) \tag{3}$$

$$\frac{\partial V_J(x,t)}{\partial x} = r_J I(x,t) \tag{4}$$

Differenziando il termine relativo alla corrente nell'ultima equazione si ottiene un'equazione differenziale di secondo grado nello spazio in cui compaiono i due termini relativi alla membrana e al substrato:

$$\frac{\partial}{\partial x} \left( \frac{1}{r_J} \frac{\partial V_J(x,t)}{\partial x} \right) = K_M(x,t) - K_S(x,t)$$
 (5)

E' possibile esplicitare i termini  $K_s(x,t)$  e  $K_M(x,t)$  tramite i parametri fisici caratteristici della giunzione e del sistema di adesione.

La densità di corrente  $K_S(x,t)$  rappresenta le proprietà elettriche di un sistema interfaccia tra una fase solida isolante, ovvero il substrato di adesione, e una fase liquida di un mezzo polare, la soluzione extracellulare. Tale interfaccia può essere schematizzata tramite un elemento capacitivo ideale  $c_S$ , considerata come capacità specifica per unità di lunghezza.

La densità di corrente  $K_M(x,t)$  dovuta alla membrana cellulare deve tenere conto sia delle proprietà di rigidità dielettrica per unità di lunghezza del doppio strato fosfolipidico tramite un termine capacitivo  $c_{JM}$ , sia dei contributi conduttivi della membrana cellulare. Essa infatti presenta contributi ohmici e contributi non ohmici, causati ad esempio dall'attivazione dei canali ionici presenti nella membrana. Il parametro  $g_{JM}$  ingloba in sé i termini conduttivi trascurando i contributi non ohmici: tale termine indica la conduttanza della membrana per unità di lunghezza a cui è associato un potenziale di inversione  $V_{JR}$  (media pesata dei contributi dei potenziali di Nerst delle diverse specie ioniche).

Le forme esplicite di  $K_S(x,t)$  e  $K_M(x,t)$  diventano:

$$K_S(x,t) = -c_S \frac{d(V_J(x,t) - V_S)}{dt}$$
(6)

$$K_{M}(x,t) = -c_{JM} \frac{d(V_{M} - V_{J}(x,t))}{dt} - g_{JM}(V_{M} - V_{J}(x,t) - V_{JR})$$
(7)

Grazie alle esplicitazioni fatte è ora possibile scrivere una relazione per il potenziale extracellulare  $V_{J}(x,t)$ :

$$\left(c_{JM} + c_S\right) \frac{dV_J(x,t)}{dt} + g_{JM} V_J(x,t) - \frac{\partial}{\partial x} \left(\frac{1}{r_J} \frac{\partial V_J(x,t)}{\partial x}\right) = c_{JM} \frac{dV_M}{dt} + g_{JM} (V_M - V_{JR}) \quad (8)$$

Per poter ottenere soluzioni in forma analitica, è necessario applicare delle approssimazioni: considerando infatti che il sistema abbia una simmetria cilindrica è possibile esprimere il potenziale extracellulare in funzione di un'unica coordinata radiale a che varia tra 0 e il raggio di adesione  $a_J$ . Inoltre i parametri fisici, ad eccezione di  $r_J$ , sono considerati per unità di superficie.

Altre approssimazioni necessarie riguardano la riduzione di alcune non uniformità presenti all'interno del sistema:  $r_J$  non avrà più una dipendenza dalla posizione, ma sarà assunta costante sull'intero raggio di adesione e la conduttanza  $g_{GM}$  sarà una funzione indipendente dal tempo e dalla tensione a cavallo della membrana.

Con tali approssimazioni l'equazione precedente diventa:

$$(c_{JM} + c_S) \frac{dV_J(a,t)}{dt} - \frac{1}{r_J} \left( \frac{d^2}{da^2} + \frac{1}{a} \frac{d}{da} \right) V_J(a,t) + g_{JM} V_J(a,t) = g_{JM} \left( V_M(t) - V_{JR} \right) + c_{JM} \frac{dV_M(t)}{dt}$$
 (9)

Se ora si considera la condizione stazionaria per la quale  $dV_J(a,t)/dt = 0$ , si è in grado di ricavare un'espressione analitica del profilo del potenziale extracellulare lungo il raggio della regione di adesione.

Le equazioni sotto riportate rappresentano rispettivamente l'equazione differenziale ridotta e la soluzione da essa ottenuta con  $V_0 = V_{JR}$ :

$$\frac{1}{r_I} \left( \frac{d^2}{da^2} + \frac{1}{a} \frac{d}{da} \right) V_J(a) = g_{JM} \left( V_M - V_0 - V_J(a) \right) \tag{10}$$

$$V_J(a) = (V_M - V_0) \left( I - \frac{I_0\left(\frac{a}{\lambda}\right)}{I_0\left(\frac{a_J}{\lambda}\right)} \right) \tag{11}$$

Dalla soluzione dell'equazione differenziale è possibile ricavare un'espressione esplicita dell'intensità della corrente che attraversa la zona di adesione: risulta necessaria per tale scopo un'integrazione del prodotto tra la conduttanza  $g_{GM}$  e la caduta di potenziale espresso in termini della funzione di Bessel. L'espressione che se ne ottiene è:

$$I_{JM} = \int_0^{a_J} 2\pi a \, g_{JM} \left( V_M - V_0 - V_J \right) da = G_{JM} \left( V_M - V_0 \right) \frac{\left( 2I_1 \left( \frac{a_J}{\lambda} \right) \right)}{\left( \frac{a_J}{\lambda} \right) \left( I_0 \left( \frac{a_J}{\lambda} \right) \right)} \tag{12}$$

#### 2.1.2 Modello a costanti concentrate

Come detto in precedenza, il modello a costanti concentrate è una semplificazione del modello a costanti distribuite, ma che permette in ogni caso di ottenere una descrizione qualitativa del comportamento del sistema ed una previsione attendibile.

In questo caso il potenziale extracellulare  $V_J(a) = V_J$  è considerato costante sull'intera area di adesione e lo strato conduttivo è rappresentato come un'unica resistenza  $R_J$  verso la periferia della zona di adesione. I parametri utilizzati in questo modello, espressi per unità di superficie, possono essere definiti in funzione dei quelli utilizzati nel modello a costanti distribuite, considerando una giunzione ideale di forma circolare con raggio  $a_J$ . Le espressioni esplicite dei termini  $C_{JM}$ ,  $G_{JM}$  e  $C_S$  risultano essere:

$$C_{IM} = c_{IM}\pi a^2$$
,  $G_{IM} = q_{IM}\pi a^2$ ,  $C_S = c_S\pi a^2$ 

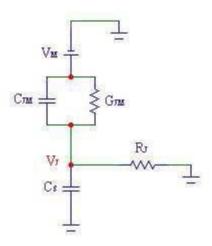


Figura 2.3 Schema circuitale del modello a costanti concentrate.

In questo caso determinare la resistenza complessiva del contatto di adesione  $R_J = G^{-1}_J$ risulta essere meno immediato utilizzando l'integrazione di una densità per unità di superficie: è pertanto utile servirsi della relazione della corrente  $I_{JM}$  ottenuta dal modello precedente e dell'espressione (seguente) ottenuta risolvendo il circuito equivalente per il nuovo modello mostrato in figura.

$$\frac{V_J}{R_I} + C_S \frac{d(V_J - V_S)}{dt} = C_{JM} \frac{d(V_M - V_j)}{dt} + G_{JM} (V_M - V_j - V_0)$$
 (13)

Se anche in questo caso si considera la condizione stazionaria per la quale si annullano le derivate rispetto al tempo e trascurando  $V_J$  si ricava la relazione per la corrente  $I_{JM}$ :

$$I_{JM} = \frac{G_J G_{JM}}{G_J + G_{JM}} (V_M - V_0) \tag{14}$$

Dal confronto tra (12) e (14) è possibile ricavare una relazione del parametro  $R_J$  che esprime la resistenza del contatto di adesione nel modello semplificato utilizzando però i termini del modello completo. Utilizzando lo sviluppo in serie di potenze per i termini in cui compaiono le funzioni di Bessel modificate, si ottiene la relazione finale:

$$R_{J} = \left(\frac{r_{J}}{8\pi}\right) \left(1 - \frac{1}{6} \left(\frac{a_{J}}{\lambda}\right)^{2} + \frac{11}{384} \left(\frac{a_{J}}{\lambda}\right)^{4} - \frac{19}{3840} \left(\frac{a_{J}}{\lambda}\right)^{6} + \cdots\right) \tag{15}$$

I passaggi fin qui descritti hanno permesso di ottenere una descrizione completa del contatto di adesione tramite una semplice relazione algebrica nella quale per  $R_J$  è presente un primo termine di ordine zero dipendente soltanto dal parametro  $r_J$ , seguito da termini dipendenti oltre che da  $r_J$  anche dalle dimensioni fisiche del contatto tramite  $a_J$  e dalle caratteristiche di conducibilità della membrana attraverso  $g_{JM}$ , con:

$$\lambda = \left(g_{JM}r_J\right)^{-1/2} \tag{16}$$

Queste considerazioni implicano che per piccoli raggi di adesione e medio bassa conduttanza della membrana  $(\frac{1}{6}\left(\frac{a_J}{\lambda}\right)^2\ll 1)$ , il modello semplificato preso in esame fornisce una descrizione adeguata del comportamento del sistema.

#### 2.1.3 Modello a due domini di stimolazione

Normalmente l'interpretazione degli esperimenti di natura elettrofisiologica si basa su tre ipotesi (*Schoen and Fromherz 2007*):

- Il potenziale elettrico all'interno del citoplasma e quello all'interno del bagno della soluzione extracellulare sono costanti;
- La differenza dei due potenziali elettrici, che corrisponde al potenziale di membrana, è data dalla differenza di tensione tra i due elettrodi di Ag/AgCl, l'uno posto nel citoplasma, l'altro nel bagno;
- La corrente attraverso tutti i domini della membrana è guidata dallo stesso potenziale di membrana.

Nel caso di stimolazione extracellulare queste assunzione non possono più essere considerate valide. Sebbene il citoplasma rimanga isopotenziale, il potenziale di transmembrana dipende dalla posizione del dominio di membrana rispetto alla posizione dove avviene la stimolazione extracellulare. Pertanto la corrente attraverso domini di membrana differenti è controllata da tensioni diverse.

Nel caso particolare in cui una cellula cresce direttamente in adesione ad una zona di stimolazione planare è possibile distinguere:

- La regione di adesione con un'elevata caduta di potenziale elettrico dovuta all'alta resistenza elettrica offerta dal sottile cleft;
- 2. La regione di membrana libera con una minore caduta di potenziale elettrico nel bagno della soluzione extracellulare circostante.

In base alle considerazioni esposte è possibile definire un modello a due domini di stimolazione (*TDS model*) che faccia affidamento su due principali approssimazioni (*Schoen and Fromherz 2007*):

- 1. La minor caduta di tensione nella regione di membrana libera è trascurabile;
- 2. Esiste una differenza di potenziale non trascurabile tra la porzione di membrana adesa ed il bagno. Questo determina che la corrente attraverso la membrana adesa è data da un potenziale diverso da quello che guida la corrente attraverso la membrana libera.

In figura 2.4 è rappresentato un sistema costituito da una cellula in adesione ad uno strato di ossido di silicio in cui la membrana adesa è separata dal substrato da un sottile film di elettrolita.

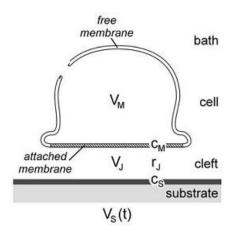


Figura 2.4 Rappresentazione di una cellula in adesione ad un substrato (modificata da *Schoen et al. 2007*)

In questo modo l'area di contatto tra gli strati isolanti (membrana e ossido) forma una linea di trasmissione bidimensionale. Quando si applica una variazione di tensione  $V_S$  al substrato semiconduttore a contatto con l'ossido, caratterizzato da una capacità specifica  $c_S$  per unità di area dipendente dal particolare materiale utilizzato, fluisce una corrente lungo la giunzione cellula-chip con una resistenza  $r_J$  e lungo la membrana cellulare, caratterizzata da capacità specifica  $c_M$  per unità di area. Si ha quindi una variazione nella giunzione del potenziale extracellulare  $V_J$ , come anche del potenziale intracellulare  $V_M$ , rispetto al bagno posto a massa. La variazione di potenziale extracellulare nelle zone di membrana libera è invece trascurabile (*Schoen and Fromherz 2007*).

Tenendo conto delle importanti caratteristiche di stimolazione di tipo capacitivo, può essere utilizzato un modello che descrive la soluzione contenuta nel cleft come un compartimento singolo equipotenziale rappresentato dal potenziale  $V_J$  che risulta indipendente dalla posizione lungo il raggio di adesione.

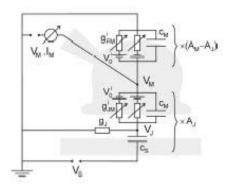


Figura 2.5 Circuito equivalente del modello TDS (Schoen et al. 2007)

E' possibile quindi distinguere due domini della membrana con area totale  $A_M$ : la regione di membrana libera con area  $A_M$  -  $A_J$ , controllata dal potenziale intracellulare  $V_M$ , e la porzione di membrana adesa con area  $A_J$ , controllata dal potenziale  $V_M$ - $V_J$ .

Il modello di stimolazione a due compartimenti è descritto da vari parametri:

- La capacità  $(A_M A_J)c_M$  e la conduttanza  $(A_M A_J)g^i_{FM}$  della membrana libera (dove  $g^i_{FM}$  è la conduttanza specifica per unità di area);
- La capacità  $A_{J}c_{M}$  e la conduttanza  $A_{J}g^{i}_{JM}$  della membrana adesa (dove  $gi_{JM}$  è la conduttanza specifica per unità di area);
- La capacità dell'area di giunzione A<sub>J</sub>C<sub>S</sub>;
- La conduttanza  $A_{J}g_{J}$  dalla giunzione al bagno. La conduttanza specifica  $g_{J} = \eta_{J}/r_{J}A_{J}$  per unità di area è definita in termini della resistenza  $r_{J}$ , dell'area della giunzione  $A_{J}$  e di un fattore geometrico  $\eta_{J} = 8\pi$  in condizioni stazionarie.

Considerando  $g^i_{FM} = g^i_{JM} = 0$  i bilanciamenti delle correnti nella cellula e nella giunzione cellula-chip sono definiti dalle seguenti espressioni:

$$\left(A_M - A_J\right)c_M \frac{dV_M}{dt} + A_J c_M \frac{d(V_M - V_J)}{dt} = I_M \tag{17}$$

$$A_J c_M \frac{d(V_J - V_M)}{dt} + A_J g_J V_J = A_J c_S \frac{d(V_S - V_J)}{dt}$$
(18)

Applicando al capacitore, posto in corrispondenza della membrana di adesione, una rampa di tensione con pendenza costante  $\Delta V_S/\Delta t_S$ , viene indotto un potenziale extracellulare  $V_J$  che determina una variazione di carica di  $\Delta V_M$  relativa alla membrana libera e una variazione  $\Delta V_{JM} = \Delta (V_M - V_J)$  relativa alla membrana adesa.

Dopo l'inizio della rampa, all'istante t = 0, si ottengono le seguenti equazioni:

$$\Delta V_M = \alpha_{JM} V_J^{\infty} \left[ 1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_J}\right) \right]$$
 (19)

$$\Delta V_{JM} = (\alpha_{JM} - 1) V_J^{\infty} \left[ 1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_J}\right) \right]$$
 (20)

dove  $V_J^{\omega} = (c_S - g_J)\Delta V_S/\Delta t_S$  rappresenta il potenziale extracellulare in condizioni stazionarie,  $\tau_J = (\hat{c}_M + c_S)/g_J$  è la costante di tempo e  $\hat{c}_M = c_M(1 - \alpha_{JM})$ ,  $\alpha_{JM} = A_J/A_M$ , è l'effettiva capacità della cellula per unità di area di adesione.

Il cambiamento di polarizzazione della membrana  $\Delta V_{JM}$  attraverso la membrana adesa segue la stessa dinamica, ma con segno opposto e con una maggiore ampiezza causata dalla differente area delle due membrane. La stessa espressione è ottenuta nello studio del comportamento alla fine dello stimolo. L'inizio e la fine della rampa sono correlate con la corrente capacitiva  $I_{JM} = A_J I_{JM}$  attraverso la membrana adesa, dove la densità di corrente è data da:

$$i_{JM}(t) = \pm \hat{c}_{JM} \frac{c_S}{\hat{c}_M + c_S} \frac{\Delta V_S}{\Delta t_S} \exp\left(-\frac{t}{\tau_J}\right)$$
 (21)

per t > 0, con segno negativo per l'inizio della rampa e positivo per la fine. L'inizio di una rampa crescente  $\Delta V_S/\Delta t_S > 0$ , determina una corrente entrante nella cellula  $i_{JM} < 0$  che induce una depolarizzazione della membrana libera, mentre la fine della stessa comporta una corrente uscente dalla cellula  $i_{JM} > 0$  che porta ad una ripolarizzazione (*Schoen and Fromherz 2007*).

#### 2.2 Dispositivo elettronico utilizzato

Durante lo sviluppo di questo progetto sperimentale si è voluto utilizzare dispositivi bioelettronici impiegati per stimolazioni capacitive rivestiti di un materiale con elevata costante dielettrica. La stimolazione di cellule depositate su chip semiconduttori ricoperti con un sottile strato di SiO<sub>2</sub> ha dimostrato essere in grado di eliminare del tutto la corrente di Faraday (*Wallrapp and Fromherz 2006*).

Per incrementare la capacità di tali dispositivi si è sostituito lo strato superficiale di  $SiO_2$  con un sottile strato di  $TiO_2$ .

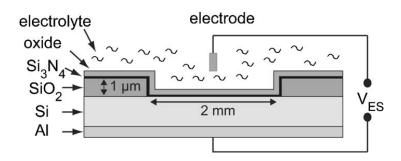


Figura 2.6 Schema della sezione di un sistema elettrolita/ossido/silicio (Wallrapp and Fromherz 2006)

Un'area circolare di 2 mm del condensatore è stata incisa per uno spessore di 1  $\mu$ m nello spesso strato di SiO<sub>2</sub> presente sul silicio p-drogato. In seguito è stato realizzato un sottile strato di TiO<sub>2</sub> tramite la tecnica definita *Atomic Layer Deposition* (ALD) depositato su un buffer di Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> (nitruro di silicio) a sua volta realizzato tramite un sistema a rapido processo termico per 30 s a 700 °C in NH<sub>3</sub> che permette di evitare la formazione di una interfaccia tra SiO<sub>2</sub> e TiO<sub>2</sub>.

Ciascun chip è stato in seguito ritagliato con una misura di  $4 \times 4 \text{ mm}^2$  ed è provvisto di un solo condensatore. Lo spessore dello strato di  $\text{TiO}_2$  misura 10.5 nm, mentre quello di nitruro di silicio è di 1.5 nm.

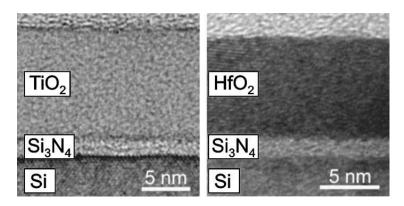


Figura 2.7 Immagine al microscopio elettronico a trasmissione dei diversi strati di ossidazione del semiconduttore (Wallrapp and Fromherz 2006)

La misura della capacità del dispositivo è realizzabile in seguito ad immersione in una soluzione elettrolita applicando differenti voltaggi tra l'elettrodo in Ag/AgCl posto nella soluzione e il punto di massa del silicio; la capacità dell'ossido misurata è pari a 1.48  $\mu$ F/cm², valore molto elevato se comparato con quello di un sistema EOS con SiO2 (0.22  $\mu$ F/cm²).

Per caratterizzare la qualità dielettrica degli strati ossidati è necessario considerare le capacità di saturazione di  $TiO_2$  a voltaggi negativi. Quando elevati voltaggi negativi sono applicati alla soluzione elettrolita, si forma nella regione di silicio p-drogato uno strato di accumulazione di lacune. La totale capacità di saturazione  $c_{sat}$  di un sistema EOS (Electrolyte-Oxide-Silicon) è data dalle seguenti capacità in serie:  $c_{acc}$  della regione di accumulazione,  $c_{IL}$  dello strato di interfaccia,  $c_{ox}$  dell'ossido e  $c_{DL}$  del doppio strato elettrico nell'elettrolita. Considerando che  $c_{ox} = \varepsilon_0 \, \varepsilon_{ox} / d_{ox}$  è possibile ottenere la relazione lineare tra  $c_{sat}$  e lo spessore dell'ossido  $d_{ox}$ :

$$\frac{1}{c_{sat}} = \left(\frac{1}{c_{DL}} + \frac{1}{c_{IL}} + \frac{1}{c_{acc}}\right) + \frac{1}{\varepsilon_0 \varepsilon_{ox}} d_{ox}$$
 (22)

La costante dielettrica ottenuta  $\varepsilon_{ox} = 33.9 \pm 1.6$  e dipende dalla struttura cristallina dell'ossido oltre che dal suo spessore e dalle condizioni di deposizione. (*Wallrapp and Fromherz 2006*).

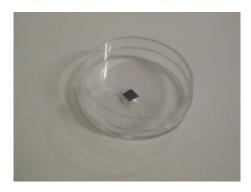


Figura 2.8 Immagine di uno dei dispositivi bioelettronici utilizzati.

I chip utilizzati durante questa sperimentazione sono stati prodotti al Max Planck Institute di Martinsried ed il diametro delle aree di stimolazione poste al centro del dispositivo varia dai 2 mm ai 125 μm. Al fine di consentirne l'utilizzo per l'elettroporazione di cellule in adesione, ciascun chip è stato disposto all'interno di una capsula di Petri in modo da permettere l'utilizzo del terreno di coltura necessario per il mantenimento delle cellule.

#### 2.3 Strumentazione ausiliaria

I processi di stimolazione sono stati verificati utilizzando due differenti tipi di microscopio:

- Olympus BX51WI (Olympus) con camera di acquisizione CCD DFC350FX (Leica);
- Nikon Eclipse 80i (Nikon Instruments) con camera di acquisizione CCD QIcam (BFY OPTILAS);

Con tale strumentazione sono state acquisite tutte le immagini, sia in luce visibile che in fluorescenza.

L'analisi e la modifica delle immagini sono state eseguite tramite l'utilizzo del software free ImageJ (http://rsbweb.nih.gov/ij/).

## 3 Materiali e metodi

In questo capitolo sono trattati i diversi materiali utilizzati durante gli esperimenti, quali il tipo di coltura cellulare, le soluzioni, i marcatori e le procedure utilizzate per eseguirli in modo consistente.

#### 3.1 Materiali utilizzati

#### 3.1.1 Linee cellulari

La linea cellulare utilizzata durante questi esperimenti è la CHO-K1 (Chinese Hamster Ovary): si tratta di cellule epiteliali di *Cricetulus griseus* con morfologia mista. Esse hanno una fase di crescita di tipo logaritmico ed un ciclo replicativo di 24 ore. E' stata scelta questa tipologia di cellule in quanto nelle precedenti esperienze del laboratorio di ricerca hanno dimostrato una buona efficienza di trasfezione durante gli esperimenti svolti con tipologie differenti di chip: esse presupponevano, pertanto, un comportamento ideale per questa tesi (*Celebrin 2007, Bazan 2007*).

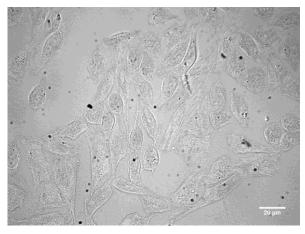


Figura 3.1 Immagine di cellule CHO-K1 su fiasca.

Il loro mantenimento avviene in incubatore ad una temperatura di  $37^{\circ}$ C e atmosfera controllata di  $CO_2$  al 5%(v/v).

#### Semina su fiasca

Le CHO-K1 sono normalmente conservate all'interno di supporti specifici, detti fiasche, nelle quali sono immerse in un terreno liquido di crescita completo e specifico per tale tipologia di cellule. Questo terreno è composto da mezzo di crescita specifico (HAM-F12), siero fetale bovino (FBS) ed antibiotici.

In base al numero di cellule poste all'interno della fiasca dopo un determinato periodo di crescita, esse raggiungono il cosiddetto stato di confluenza oltre il quale devono essere trasferite diluite su un nuovo supporto. Deve essere, quindi, attuato il processo di tripsinizzazione che deve avvenire in ambiente sterile e che permette una successiva semina su una nuova fiasca.

I principali passaggi di tale processo sono i seguenti:

- Rimuovere il terreno presente all'interno della fiasca;
- Sciacquare cautamente con 3-4 ml di soluzione PBS la coltura cellulare, in modo da rimuovere possibili residui del mezzo precedentemente aspirato che potrebbero inattivare l'enzima tripsina;
- Introdurre nella fiasca 500 μl di tripsina: essa è un enzima in grado di rompere i legami tra le molecole di adesione permettendo quindi il distaccamento delle cellule dal supporto;
- Lasciare agire la tripsina per 1 minuto a 37°C;
- Inattivare la tripsina con 5 ml di terreno completo nella fiasca, aspirare l'intero contenuto, riporlo in una provetta sterile e centrifugare per 5 minuti a 250g ad una temperatura di 37°C;
- Rimuovere il surnatante e risospendere il pellet cellulare con 3ml di terreno completo;
- Contare le cellule presenti all'interno della provetta tramite camera di Burker: lo strumento permette di contare le cellule per millilitro di soluzione in modo da poterne seminare un numero preciso nella nuova fiasca;
- Seminare nella quantità desiderata le cellule nelle nuova fiasca in presenza di terreno completo.

#### Semina su chip

La semina delle cellule sui dispositivi utilizzati è una fase delicata della sperimentazione, in quanto per poter effettuare l'elettroporazione è necessario che le cellule seminate siano presenti sopra l'area di stimolazione. Per ogni esperimento vengono utilizzate circa 10000 cellule per chip.

La pulizia del chip avviene ad ogni utilizzo prima della semina delle cellule tramite lavaggio con un detergente per la rimozione di residui cellulari (tikopur 5% v/v), seguito da abbondanti lavaggi con acqua deionizzata. Il chip, infine, viene sterilizzato mediante etanolo.

#### 3.1.2 Soluzioni

#### ■ Terreno di coltura completo per le CHO-K1:

- Terreno di coltura (HAM-F12, Invitrogen-Gibco) addizionato di L-glutammina;
- FBS (Foetal bovine serum, Invitrogen-Gibco) 10%;
- Antibiotici (Penicillina 10 u/ml, Streptomicina 10 μg/ml, Invitrogen-Gibco).

#### PBS (Phosphate Buffered Saline) pH 7.4

- KCl 2.7 mM (Sigma-Aldrich);
- NaCl 137.0 mM (Sigma-Aldrich);
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10.0 mM (Sigma-Aldrich);
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.0 mM (Sigma-Aldrich).

#### Tripsina-EDTA

- Tripsina 0.25 g/l (Invitrogen);
- EDTA 4 Na 0.02 g/l (Sigma-Aldrich).

### Soluzione Buffer1 (B1) (Vassanelli et al. 2008)

#### 3.1.3 Marcatori

Al fine di valutare l'avvenuta transfezione, durante gli esperimenti svolti per questa tesi, sono stati utilizzati tre differenti tipi di marcatori: Trypan Blue, Falloidina e plasmide codificante EYFP.

**Trypan Blue** 0.08% (v/v) (*MW* 891.8 Da) (Sigma-Aldrich Co.) in B1

Figura 3.2 Formula di struttura del Trypan Blue

Si tratta di un colorante vitale in grado di marcare selettivamente le cellule morte. L'elevata selettività della membrana cellulare di una cellula viva non permette, in condizioni normali, al Trypan Blue di penetrare all'interno della cellula, viceversa nelle cellule morte manca il processo di selezione e quindi permette di renderle distinguibili dalle vive con una semplice analisi al microscopio.

Il Trypan Blue è spesso utilizzato negli studi sull'elettroporazione in quanto è una molecola con un basso peso molecolare, fattore questo che facilita il suo ingresso nella cellula. La colorazione di una cellula viva in presenza del marcatore indica che esso è riuscito ad entrare nella cellula tramite i micropori che si sono creati e che quindi il processo di elettroporazione ha avuto successo.

## Falloidina A<sub>568</sub> 0.8 U (*MW* 1590 Da) (Invitrogen<sup>TM</sup>) in B1

Figura 3.3 Formula di struttura della Falloidina

La Falloidina è una micotossina che è in grado di legarsi all'actina polimerizzata (F-actina, actina filamentosa) mettendo in evidenza i filamenti di actina del citoscheletro della cellula. L'actina interviene durante il processo di adesione e movimento cellulare: essa forma delle strutture polimeriche che costituiscono i microfilamenti del citoscheletro. Tali strutture sono anche dette *stress fibers*.

La Falloidina utilizzata nel corso di questa sperimentazione è coniugata con il fluoroforo Alexa 568 che emette nel rosso: questa modificazione permette di valutare l'esito degli esperimenti in fluorescenza.

## Plasmide pcDNA3(-) codificante EYFP (MW 3.7 x 10 $^6$ Da; 6.1bp): 2 µg in B1.

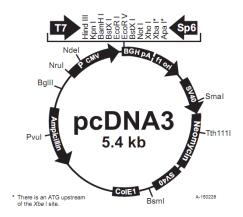


Figura 3.4 Rappresentazione schematica del plasmide pcDNA3 codificante EYFP (<a href="http://www.synthesisgene.com/vector/pcdn">http://www.synthesisgene.com/vector/pcdn</a> a3.pdf)

Si tratta di un plasmide che reca il DNA codificante la proteina EYFP (*Enhanced Yellow Fluorescent Protein*) e ne permette l'espressione in cellule di mammifero.

La transfezione di tale molecola all'interno della cellula consente di ricavare due ulteriori informazioni rispetto agli esperimenti con gli altri marcatori:

- Dimensione dei pori: come è già stato affermato in precedenza, è
  possibile stimare l'ordine di grandezza dei pori in base alla dimensione
  delle molecole che entrano nella cellula. Poiché il plasmide è di circa tre
  ordini di grandezza più grande degli altri marcatori utilizzati, è possibile
  dedurre che altre molecole con elevato peso molecolare (come ad
  esempio gli anticorpi) possono essere introdotte nella cellula tramite
  elettroporazione;
- 2. Attraversamento della membrana nucleare e vitalità cellulare: la sintesi della proteina fluorescente implica che il DNA è entrato nel nucleo ed è stato trascritto in RNA dal quale la proteina è stata tradotta e che pertanto la cellula è in un buono stato fisiologico.

#### 3.2 Metodi

#### 3.2.1 Forme d'onda per stimolazione

- Impulso A: impulso con 0% di saturazione del segnale (¹).
   Questa tipo di stimolazione è stata utilizzata per gli esperimenti di elettroporazione con Trypan Blue, Falloidina e DNA.
- Impulso B: impulso con 50% di saturazione del segnale (¹).
  Questo secondo tipo è stato invece utilizzato per gli esperimenti di elettroporazione effettuati con Trypan Blue e Falloidina.

<sup>(1)</sup> I dettagli degli impulsi sono stati omessi in quanto potenzialmente brevettabili.

#### 3.2.2 Protocolli di elettroporazione

#### **Esperimenti con Trypan Blue**

- Analisi tramite microscopio delle condizioni morfologiche delle cellule presenti sul chip, in modo da verificarne la vitalità e contemporanea verifica della presenza di cellule sull'area di stimolazione del chip. Documentazione dei chip tramite fotocamera.
- Elettroporazione cellulare:
  - Rimozione del terreno di coltura;
  - Deposizione di 1.5ml di soluzione B1 con Trypan Blue;
  - Posizionamento del chip sul sistema di stimolazione;
  - Posizionamento dell'elettrodo nella soluzione;
  - Stimolazione tramite generatore di impulsi;
  - Rimozione del chip dal sistema di stimolazione e incubazione per 2 minuti;
- Verifica dell'esito dell'esperimento tramite microscopio. Si considera avvenuta l'elettroporazione se le cellule presenti sull'area di stimolazione sono colorate e se hanno conservato un buono stato di salute (morfologia della cellula).
  - Rimozione della soluzione con Trypan Blue;
  - Risciacquo del chip con PBS;
  - Analisi al microscopio in luce visibile delle condizioni delle cellule (colorazione e morfologia);
  - Acquisizione di immagini tramite fotocamera per il confronto pre e post elettroporazione.

#### Esperimenti con Falloidina

Il protocollo utilizzato per questi esperimenti è lo stesso di quello presentato precedentemente per il Trypan Blue. Uniche differenze presenti sono:

- Deposizione di 20µl di soluzione di Buffer1 con Falloidina direttamente sull'area di stimolazione;
- Incubazione per 5 minuti del chip;

- Osservazione al microscopio sia in luce visibile che in fluorescenza.

#### **Esperimenti con plasmide codificante EYFP**

Il protocollo utilizzato per questi esperimenti è lo stesso di quello presentato per il Trypan Blue. L'intera fase di elettroporazione deve essere svolta in ambiente sterile. Differenze presenti nelle diverse fasi sono:

- Deposizione di 20µl di soluzione di DNA in Buffer1.
- Incubazione per 5 minuti con sola soluzione con DNA e successiva aggiunta di terreno completo per consentire un'incubazione di 24 ore in incubatore.
- Osservazione al microscopio sia in luce visibile che in fluorescenza.

#### 3.2.3 Test di selettività

Questo tipo di test permette di dimostrare la specificità di stimolazione che si ottiene attraverso l'utilizzo del dispositivo elettronico in questione. Si verifica la presenza di cellule sull'area specifica di stimolazione e si invia l'impulso al chip: confrontando le immagini acquisite pre e post stimolazione ci si attende che cellule elettroporate siano presenti solo sull'area stimolata.

## 4 Risultati

In questo capitolo sono esposti i risultati ottenuti durante il lavoro di tesi. Viene presentata un'analisi del comportamento del segnale nel sistema di elettroporazione e successivamente verranno discussi gli esperimenti con le varie sostanze utilizzate per le prove di elettroporazione, che vanno dal colorante vitale Trypan Blue, alla Falloidina, marcatore per l'actina polimerizzata, ed infine all'espressione della proteina fluorescente EYFP.

## 4.1 Analisi della modificazione del segnale

In una prima fase della sperimentazione si è voluto verificare in che modo il segnale venga modificato dal sistema. A tale scopo è stata analizzata la differenza del segnale inviato dal generatore di funzione e del segnale trasmesso alla soluzione di elettroporazione dal microchip. Per tale verifica è stato utilizzato un oscilloscopio in grado di determinare la frequenza, la misura picco-picco e lo sfasamento dei due segnali rilevati, l'uno derivante dal generatore di impulso e l'altro misurato tramite elettrodo immerso nel nella soluzione di elettroporazione. E' stato impiegato un segnale di tipo sinusoidale con ampiezza costante ±200 mV a differenti frequenze e con un campionamento pari a 64.

FREQUENZA (Hz)	f1 (Hz)	f2 (Hz)	Fase (1-2) (°)	P-P (1) (mV)	P-P (2) (mV)
20000000	20000000	20000000	80	309	21,82
10000000	10000000	10000000	75	350	45,5
5000000	5000000	5000000	68	378	86,3
1000000	1000000	1000000	41	393	252
100000	100000	100000	7	400	386
10000	10000	10000	2	400	395
1000	1000	1000	0	400	396
100	100	100	0	400	395
10	10	10	0	400	392
1	1	1	-41	399	289
0,1	0,1	0,1	-80	200,4	22,4

Tabella 4.1 Risultati della verifica: canale 1: segnale del generatore di impulsi; canale 2: segnale rilevato nel bagno del chip. Sono mostrati i dati relativi alle frequenze di ciascun segnale, al loro sfasamento e alla misura picco-picco.

Tramite questo controllo si evince che per l'intervallo di frequenze tra i 10 Hz e 1 KHz il segnale non subisce alcun sfasamento ed il valore picco-picco del segnale rilevato nel elettrolita è comparabile a quella del segnale del generatore di impulso. Le frequenze utilizzate negli esperimenti di elettroporazione tengono conto di queste informazioni al fine di non avere grosse modifiche tra il segnale inviato ed il segnale che effettivamente viene generato nel sistema.

Per frequenze inferiori o superiori a tale intervallo, il segnale misurato nell'elettrolita subisce invece modificazioni che ne determinano l'inutilizzabilità per lo specifico sistema di stimolazione utilizzato.

## 4.2 Ottimizzazione del protocollo di stimolazione

La transfezione di DNA o altre molecole esogene tramite elettroporazione è una tecnica ormai consolidata e comunemente utilizzata. La sperimentazione si è svolta in un laboratorio in cui è stata ottenuta con successo la possibilità di elettroporare cellule fatte crescere in adesione su microchip rivestiti con ossido di silicio aventi 64 siti di stimolazione. Si è quindi pensato di utilizzare i protocolli sviluppati per tali dispositivi e verificarne la possibilità di utilizzo con i prototipi a

spot singolo. Per questo motivo, prima di procedere con gli effettivi esperimenti di elettroporazione, è stato necessario verificarne l'efficienza.

Per considerare la validità del protocollo di elettroporazione è stata considerata l'efficienza di tale impulso come:

$$Efficienza = \frac{Numero\ di\ chip\ positivi}{Numero\ di\ chip\ stimolati}$$

Sono stati considerati *positivi* quei chip nei quali almeno una cellula fosse risultata transfettata all'interno della area di stimolazione. I chip sono stati utilizzati nei diversi esperimenti solo nel momento in cui almeno una cellula fosse presente sullo spot di stimolazione.

I protocolli utilizzati con i chip rivestiti con ossido di silicio a 64 siti sono stati applicati per controllare l'efficienza di elettroporazione dei nuovi prototipi a condensatore singolo in ossido di titanio e hanno dato un'efficienza di elettroporazione pari al 25%. Si è quindi deciso di operare delle modifiche nei parametri dell'impulso al fine di aumentarne l'efficienza. Utilizzando come marcatore il colorante vitale Trypan Blue sono stati variati differenti parametri, quali frequenza , intensità e percentuale di saturazione del segnale, per determinare il protocollo migliore per l'elettroporazione.

#### Ottimizzazione del protocollo di stimolazione

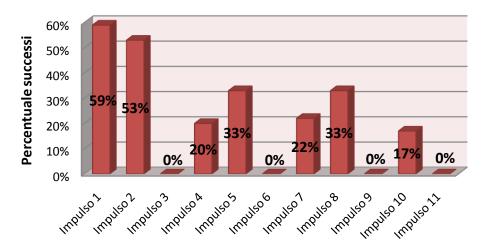


Grafico 4.1: Visualizzazione grafica tramite istogramma dell'efficienza di ciascun tipo di impulso. N=150

Come è mostrato dal grafico 4.1, i due impulsi che presentano la migliore efficienza di elettroporazione sono il n°1 ed il n°2. Gli altri tipi di stimolazione hanno evidenziato tutti un'efficienza inferiore al 50% e pertanto, data la scarsa efficienza, non sono stati utilizzati per i successivi esperimenti.

Di seguito sono proposti i risultati degli esperimenti di elettroporazione svolti con gli impulsi 1 e 2 tramite l'utilizzo dei tre differenti marcatori presentati nel capitolo precedente.

### 4.3 Elettroporazione con Trypan Blue

Per valutare l'efficienza di elettroporazione dei due tipi di impulso è stato utilizzato il colorante vitale Trypan Blue. Tale sostanza viene internalizzata dalle cellule che subiscono elettroporazione risultando colorate di blu e quindi facilmente riconoscibili da quelle non elettroporate che appaiono incolori.

## Efficienza con Trypan Blue

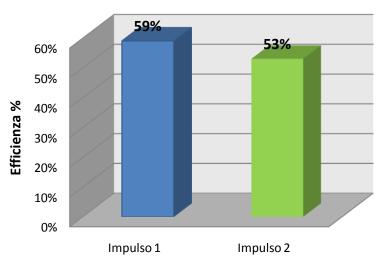
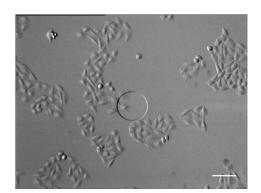


Grafico 4.2 Istogramma dell'efficienza di elettroporazione con Trypan Blue con i due diversi tipi di stimolazione. N=100

Il grafico 4.2 mostra che l'Impulso 1 è quello che durante la sperimentazione con Trypan Blue ha ottenuto la migliore efficienza di elettroporazione. In entrambi i casi la percentuale di efficienza è superiore al 50% dimostrando la validità degli stimoli utilizzati: si è pertanto deciso di verificare l'efficacia di tali protocolli anche per la Falloidina.

Vengono di seguito mostrati alcuni esempi di elettroporazione eseguiti con Trypan Blue utilizzando gli impulsi 1, fig.4.1, e 2 fig.4.2. La morfologia delle cellule in seguito all'elettroporazione non risulta alterata come si può notare in figura 4.1. In figura 4.2 viene mostrato, invece, un caso in cui si è verificata una lieve modificazione morfologica delle cellule in seguito all'elettroporazione. E' possibile osservare come il cambiamento morfologico sia presente su tutta la coltura cellulare e non solo sulle cellule presenti sullo spot di stimolazione.

L'elevata selettività del dispositivo è evidenziata dal fatto che solamente le cellule cresciute sopra lo spot di stimolazione incorporino il colorante vitale Trypan Blue, come si può vedere nelle figure 4.1 e 4.2. Le restanti cellule, subito adiacenti al sito di stimolazione e nella restante area del dispositivo, risultano incolori e pertanto non elettroporate. È da evidenziare come la differente numerosità delle cellule in adesione non infici la selettività ed il processo di elettroporazione.



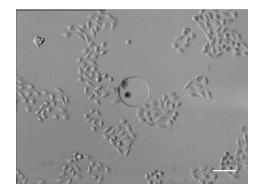
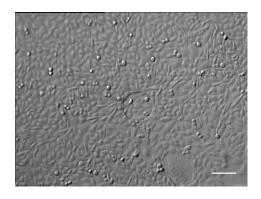


Figura 4.1 sx: Immagine in luce visibile a 40x del chip prima dell'elettroporazione. dx: Immagine in luce visibile a 40x del chip dopo l'elettroporazione con Impulso 1. Barra della scala:  $100 \, \mu m$ 



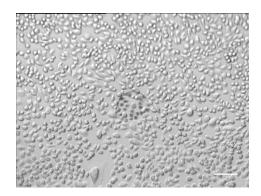


Figura 4.2 sx: Immagine in luce visibile a 40x del chip prima dell'elettroporazione. dx: Immagine in luce visibile a 40x del chip dopo l'elettroporazione con Impulso 2. Barra della scala:  $100 \mu m$ 

## 4.4 Elettroporazione con Falloidina

In seguito ai risultati positivi ottenuti con il colorante vitale Trypan Blue, è stato deciso di utilizzare un marcatore per una struttura subcellulare, il citoscheletro. Questo marcatore, derivante da una micotossina (Falloidina), è coniugato con un fluoroforo che fluoresce nella lunghezza d'onda del rosso. La falloidina, legandosi all'actina polimerizzata, permette di osservare la porzione del citoscheletro costituita dai microfilamenti.

#### Efficienza con Falloidina

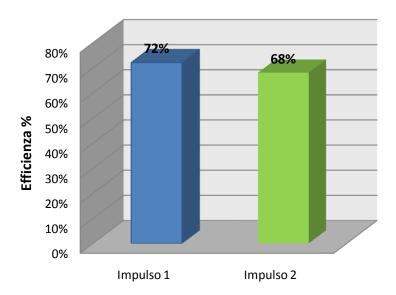


Grafico 4.3 Istogramma dell'efficienza di elettroporazione con Falloidina con i due diversi tipi di stimolazione. N=100.

Il grafico 4.3 mostra che, anche in questo caso, la stimolazione con l'Impulso 1 ha avuto una maggiore efficienza di elettroporazione rispetto a quella effettuata con l'Impulso 2. Entrambi i tipi di impulso hanno evidenziato elevata efficienza di transfezione, essendo in un caso superiore al 70% e nell'altro di poco inferiore. Tali risultati dimostrano nuovamente la validità delle stimolazioni utilizzate, rendendo questa tecnica utile anche per la marcatura di una struttura subcellulare come il citoscheletro.

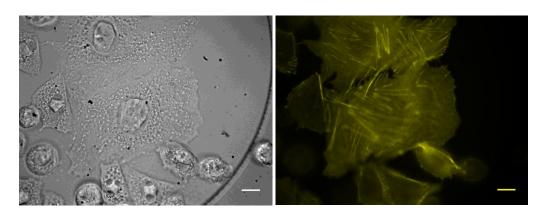


Figura 4.3 sx: Immagine in luce visibile a 60x del chip dopo l'elettroporazione con Impulso 1. dx: Immagine in falsi colori a 60x del chip dopo l'elettroporazione con impulso 1. Barra della scala: 10µm.

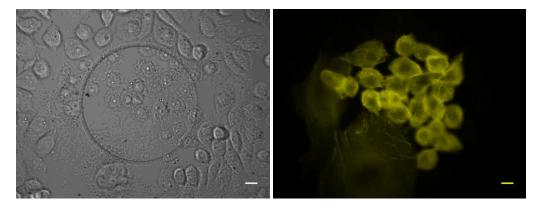


Figura 4.4 sx Immagine in luce visibile a 40x del chip dopo l'elettroporazione con Impulso 2. dx: Immagine in falsi colori a 40x del chip dopo l'elettroporazione con Impulso 2. Barra della scala: 10 µm.

Come è possibile osservare dalle figure 4.3 e 4.4 l'elettroporazione è avvenuta, anche in questo caso, con elevata selettività: solo le cellule presenti sullo spot di stimolazione sono state transfettate con la Falloidina e la visualizzazione in

fluorescenza ne ha permesso una chiara identificazione. In particolar modo in figura 4.3, dove è stato utilizzato un ingrandimento maggiore, è possibile osservare distintamente le *stress fibers*, strutture filamentose del citoscheletro alle quali si lega la Falloidina.

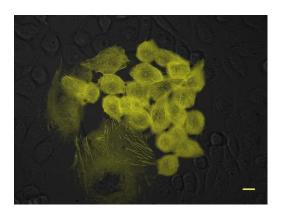


Figura 4.5: Sovrapposizione dell'immagine 4.4 sx e dx. Barra della scala: 10µm.

In figura 4.5 è stato evidenziato mediante sovrapposizione dell'immagine in visibile ed in fluorescenza un'elettroporazione con Falloidina; si può notare l'elevata specificità del processo in cui solamente le cellule sovrastanti il sito di stimolazione internalizzano la tossina marcata.

## 4.5 Espressione della proteina fluorescente EYFP

In seguito ai risultati positivi ottenuti con il colorante vitale Trypan Blue e con il marcatore per il citoscheletro Falloidina, i quali hanno permesso sia la valutazione dell'avvenuta elettroporazione sia la verifica dello stato morfologico della cellula, è stato deciso di monitorare anche la vitalità cellulare. A tale scopo, attraverso l'espressione della proteina fluorescente EYFP, è stato transfettato un plasmide che ne contiene il gene, il quale, se correttamente internalizzato, determina la produzione della proteina.

Attraverso la verifica della fluorescenza che si sviluppa dopo circa 24 h, è stato possibile monitorare la vitalità cellulare in seguito all'elettroporazione: solo una

cellula vitale e metabolicamente sana produce la proteina e pertanto la sua fluorescenza diventa essere un fattore discriminante per l'esito dell'esperimento. L'efficienza maggiore durante i precedenti esperimenti (utilizzando Trypan Blue e Falloidina) è stata ottenuta tramite l'Impulso 1 e si è quindi scelto di utilizzare solo tale impulso per ottimizzare gli esperimenti.

L'efficienza di elettroporazione con il plasmide codificante per la EYFP è stata del 79% (N=15). Tale valore di efficienza risulta essere molto elevato per la tipologia di transfezione effettuata: la dimensione del plasmide è, infatti, di tre ordini di grandezza maggiore rispetto ai due marcatori precedentemente utilizzati. Questi esperimenti enfatizzano, inoltre, come l'elettroporazione in adesione sia ben tollerata dalle cellule in quanto a distanza di molte ore dalla stimolazione esse conservano ottimamente la vitalità cellulare che permette la sintesi di una proteina esogena.

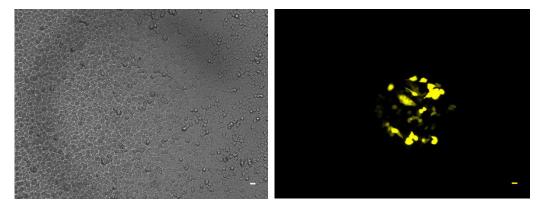


Figura 4.6 sx: Immagine in luce visibile a 10x del chip dopo 24 h dall'elettroporazione con Impulso 1. dx: Immagine in fluorescenza a 10x del chip dopo 24h dall'elettroporazione con Impulso 1. Barra della scala: 10µm.

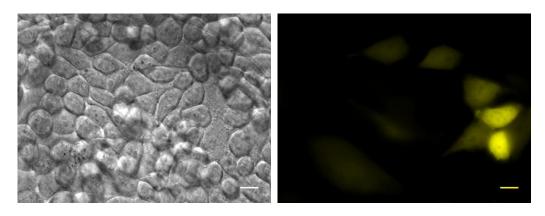


Figura 4.7 sx: Immagine in luce visibile a 60x del chip dopo 24 h dall'elettroporazione con Impulso 1. dx: Immagine in fluorescenza a 60x del chip dopo 24h dall'elettroporazione con Impulso 1. Barra della scala: 10μm.

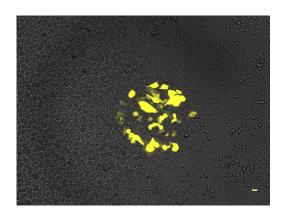


Figura 4.8 Sovrapposizione dell'immagine 4.6 sx e dx. Barra della scala: 10µm.

Le immagini in figura 4.6 evidenziano l'elevata selettività del sistema di stimolazione utilizzato. Mettendole a confronto si può vedere come solo le cellule presenti sull'area di stimolazione subiscano elettroporazione: nessuna delle cellule circostanti presenta in fluorescenza transfezione del plasmide. Le immagini in figura 4.7 dimostrano, inoltre, una buona vitalità delle cellule: la presenza di cellule fluorescenti dimostra che non solo il plasmide è stato transfettato all'interno della cellula, ma che è riuscito ad introdursi nel nucleo e determinare quindi la produzione della proteina ad esso associata.

In figura 4.8 è stato evidenziato mediante sovrapposizione dell'immagine in visibile ed in fluorescenza un'elettroporazione con il plasmide per l'espressione di EYFP. Si può notare l'elevata specificità del processo in cui solamente le cellule sovrastanti il sito di stimolazione esprimono la proteina fluorescente.

## 4.6 Confronto tra i risultati ottenuti

In questo paragrafo ci si propone di confrontare i risultati ottenuti nelle diverse sperimentazioni tramite l'utilizzo dei tre diversi marcatori: Trypan Blue, Falloidina e plasmide codificante EYFP.

### Efficienze di elettroporazione

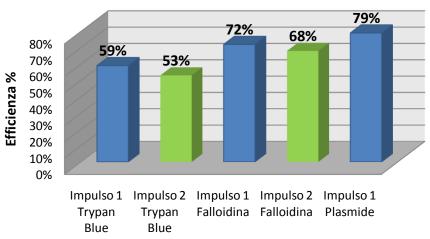


Grafico 4.4 Istogramma delle efficienze di elettroporazione evidenziate dagli esperimenti con Trypan Blue. Falloidina e Plasmide tramite le differenti stimolazioni.

Come è mostrato nel grafico 4.4, l'Impulso 1 ha dimostrato avere le migliori prestazioni in termini di efficienza di elettroporazione sia nel caso di transfezione di Trypan Blue che in quello di Falloidina.

L'elevato valore delle efficienze ottenute, soprattutto nel caso di transfezione di Falloidina e plasmide codificante EYFP, dimostra che i protocolli di stimolazione seguiti durante questo lavoro di sperimentazione sono adeguati agli obbiettivi del lavoro. Durante la fase di transfezione con Falloidina è stata notata, in alcuni casi, una differente intensità di fluorescenza delle cellule transfettate a seconda del protocollo utilizzato: l'utilizzo dell'Impulso 2 come segnale di stimolazione ha determinato, infatti, una colorazione minore delle cellule rispetto agli esperimenti svolti utilizzando l'Impulso 1, dimostrando una minore quantità di marcatore transfettato. Tale osservazione verrà controllata in successivi esperimenti per verificarne la reale veridicità.

Si è cercato inoltre di verificare se la differente dimensione dello spot di stimolazione avesse una particolare influenza sull'efficienza di transfezione dei marcatori esogeni per i protocolli utilizzati: i risultati non hanno evidenziato una particolare tendenza di comportamento delle cellule nei diversi casi, mantenendo sempre una certa variabilità nell'esito dell'elettroporazione, cosa normale quando si tratta di sistemi biologici.

Gli esperimenti svolti nelle differenti fasi del progetto sembrano mostrare una maggiore facilità di elettroporazione di cellule su chip dotati di spot di

stimolazione più piccoli. Queste osservazioni dovranno esser anch'esse verificate in un successivo lavoro che verterà sull'analisi dell'influenza della grandezza dello spot di stimolazione sulla elettroporazione. Infine un altro fattore da monitorare sarà la dipendenza dell'elettroporazione dal numero di utilizzi dei chip e del numero di cellule presenti sull'area di stimolazione.

## 5 Conclusioni

Il progetto di sperimentazione sviluppato durante questa tesi verte sull'utilizzo di un particolare tipo di microchip in silicio contenenti siti capacitivi per l'elettroporazione di cellule in adesione. Tali chip sono dotati di una struttura EOS (Electrolyte Oxide Semiconductor) e dispositivi ricoperti di SiO<sub>2</sub> sono stati utilizzati con successo per la formazione di pori nella membrana plasmatica delle cellule. In questo elaborato sono stati utilizzati dei prototipi analoghi rivestiti con TiO<sub>2</sub>, materiale che oltre ad aumentare la biocompatibilità favorisce l'adesione cellulare e di conseguenza anche l'efficienza di elettroporazione.

Nella realizzazione dei differenti esperimenti sono state utilizzate le cellule CHO-K1, in quanto sono in grado di aderire facilmente al substrato del chip ed hanno inoltre mostrato una elevata efficienza di elettroporazione in progetti precedentemente realizzati in questo laboratorio.

Per verificare l'effettiva transfezione cellulare diversi tipi di marcatori sono stati utilizzati. In una prima fase della sperimentazione si è utilizzato il Trypan Blue, molecola di piccole dimensioni non diffusibile in cellule vive, ma che permea in cellule elettroporate. I due differenti tipi di impulso utilizzati hanno mostrato entrambi una buona efficienza di transfezione della molecola (59% per l'Impulso 1 e 53% per l'Impulso 2) e sono stati pertanto impiegati senza modificazioni per i successivi esperimenti con la Falloidina. Nonostante tale molecola presenti dimensioni maggiori rispetto al Trypan Blue, l'efficienze rilevate sono state rispettivamente del 72% per l'Impulso 1 e del 68% per l'Impulso 2. Nel corso degli esperimenti è stata inoltre evidenziata una buona vitalità delle cellule in seguito al processo di elettroporazione ed un'elevata selettività di transfezione, condizioni fondamentali per la determinazione della validità del dispositivo di stimolazione.

L'ultima fase della sperimentazione è stata caratterizzata dall'utilizzo del plasmide codificante la EYFP che ha un peso molecolare di circa tre ordini di grandezza superiore ai marcatori precedentemente utilizzati. Gli esperimenti condotti utilizzando l'Impulso 1 per la stimolazione hanno evidenziato un'efficienza pari al 79%, che è da considerarsi un ottimo risultato in relazione

alle caratteristiche della molecola utilizzata. L'avvenuta sintesi della proteina è inoltre indice di una buona vitalità delle cellule anche in seguito alla stimolazione.

I risultati degli esperimenti realizzati in questa tesi mostrano che il numero di utilizzi per ciascun chip non è un fattore limitante l'effettiva transfezione e che l'elevata biocompatibilità dell'ossido di titanio permette di mantenere un buono stato fisiologico delle cellule in adesione anche dopo l'elettroporazione. Le considerazioni fino al momento fatte consentono di affermare che i chip utilizzati in questo progetto sono un valido strumento di transfezione cellulare tramite elettroporazione in adesione.

Sviluppi futuri prevedono l'ottimizzazione dei protocolli di elettroporazione in modo da poter incrementare l'efficienza di transfezione cellulare. Nuovi esperimenti potranno essere condotti utilizzando differenti molecole marcatori, quali ad esempio gli anticorpi, e si verificherà la validità dei protocolli utilizzati per le CHO-K1 per altre linee cellulari, tra cui ad esempio i neuroni. Si potrà inoltre cercare di descrivere, tramite l'utilizzo di differenti tipi di impulsi, quale dipendenza esiste tra la dimensione dello spot di stimolazione e l'efficienza di transfezione delle cellule presenti su di esso: questo permetterà di ottenere i migliori protocolli per ciascun tipo specifico di chip utilizzato.

# Bibliografia

Belehradek M., Domenge C., Luboinski B., Orlowski S., Belehradek J. Jr. & Mir L.M. (1993). Electrochemotherapy, a new antitumor treatment. First clinical phase I-II trial. *Cancer* **72**, 3694-3700.

**Bazan M. C.** (2007). Utilizzo di strutture EOS (Electrolyte Oxide Semiconductor) per elettroporazione di cellule di mammifero in coltura. *Tesi di laurea in Ingegneria Biomedica, Università degli Studi di Padova.* 

**Celebrin M.** (2007). Sviluppo di una tecnica di transfezione di neuroni di ippocampo di ratto mediante elettroporazione di singola cellula su chip. *Tesi di laurea in Bioingegneria, Università degli Studi di Padova*.

**Chernomordik L. V.** (1992). Electropores in Lipids Bilayers and Cell Membranes, in D. C. Chang (et al.), *Guide to Electroporation and Electrofusion, chap 5, Academic Press, Inc., San Diego, CA*.

**Davalos R., Huang Y. & Rubinsky B.** (2000). Electroporation: Bioelectrochemical mass transfer at the nano scale. *Microscale Thermophysical Engineering*, **4,** 147-159.

**Di Bello C.** (2004). Biomateriali - Introduzione allo studio dei materiali per uso biomedico. **4,** 101-132.

**Ganong W. F.** (2006). Fisiologia medica. 10<sup>a</sup> Edizione Italiana. 1, 8-26.

**Gao X., Kim KS. & Liu D.** (2007). Nonviral Gene Delivery: What We Know and What Is Next, *AAPS J.* **9,** 92-104.

**Gehl, J., Sørensen, T.H., Nielsen, K.** *et al.* (1999). In vivo electroporation of skeletal muscle: threshold, efficacy and relation to electric field distribution. *Biochim Biophys Acta* **1428**, 233-240.

**Gehl, J. & Geertsen, P.** (2000). Efficient palliation of hemorrhaging malignant melanoma skin metastases by electrochemotherapy. *Melanoma Res* **10**, 585-589.

- **Gehl J.** (2003). Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. *Acta Physiol Scand* **177**, 437-447.
- **Glogauer M. & McCulloch C.A.** (1992). Introduction of large molecules into viable fibroblasts by electroporation: optimization of loading and identification of labeled cellular compartments. *Exp Cell Res* **200**, 227-234.
- Golzio, M., Mora, M.P., Raynaud, C., Delteil, C., Teissie, J. & Rols, M.P. (1998). Control by osmotic pressure of voltage induced permeabilization and gene transfer in mammalian cells. *Biophys J* **74**, 3015-3022.
- **Heller, R., Jaroszeski, M., Leo-Messina, J.** *et al.* (1995). Treatment of B16 mouse melanoma with the combination of electropermeabilization and chemotherapy. *Bioelectrochem Bioenerget* **36**, 83-87.
- **Heller, R., Jaroszeski, M.J., Reintgen, D.S.** *et al.* (1998). Treatment of cutaneous and subcutaneous tumors with electrochemotherapy using intralesional bleomycin. *Cancer* **83,** 148-157.
- **Kinosita, K. & Tsong, T.Y.** (1977a). Voltage-induced pore formation and hemolysis of human erythrocytes. **Biochim Biophys Acta 471**, 227-242.
- **Melvik, J.E., Pettersen, E.O., Gordon, P.B. & Seglen, P.O.** (1986). Increase in cisdichlorodiammineplatinum (II) cytotoxicity upon reversible electropermeabilization of the plasma membrane in cultured human NHIK 3025 cells. *Eur J Cancer Clin Oncol* **22,** 1523-153.
- **Miklavcic D. & Puc M.** (2006). Electroporation, *University of Ljubliana (Ljubljana, Slovenia); Wiley Encyclopedia of Biomedical Engineering.*
- Mir, L.M., Banoun, H. & Paoletti, C. (1988). Introduction of definite amounts of nonpermeant molecules into living cells after electropermeabilization: direct access to the cytosol. *Exp Cell Res* **175**, 15-25.
- Mir, L.M., Orlowski, S., Belehradek, J., Jr., & Paoletti, C. (1991). Electrochemotherapy potentiation of antitumour effect of bleomycin by local electric pulses. *Eur J Cancer* **27**, 68-72.
- Mir, L.M., Glass, L.F., Sersa, G. et al. (1998). Effective treatment of cutaneous and subcutaneous malignant tumors by electrochemotherapy. Br J Cancer 77, 2336-2342.

Mir, L.M., Bureau, M.F., Gehl, J. et al. (1999). High efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. *Proc Natl Acad Sci* USA **96**, 4262-4267.

**Neumann E., Schaefer-Ridder M., Wang Y. & Hofschneider P.H.** (1982). Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J.* **1,** 841-845.

**Neumann, E., Toensing, K., Kakorin, S., Budde, P. & Frey, J.** (1998). Mechanism of electroporative dye uptake by mouse B cells. *Biophys J* **74,** 98-108.

Salford, L.G., Persson, B.R., Brun, A., Ceberg, C.P., Kongstad, P.C. & Mir, L.M. (1993). A new brain tumour therapy combining bleomycin with in vivo electropermeabilization. *Biochem Biophys Res Commun* **194**, 938-943.

**Schoen I. and Fromherz P.** (2007). The Mechanism of Extracellular Stimulation of Nerve Cells on an Electrolyte-Oxide-Semiconductor Capacitor. *Biophysical Journal* **92,** 1096-1111.

**Schoenbach K.H., Beebe S.J. & Buescher E.S.** (2001). Intracellular effect of ultrashort electrical pulses. *Bioelectromagnetics* **22,** 440-448.

Sersa, G., Stabuc, B., Cemazar, M., Miklavcic, D. & Rudolf, Z. (2000a). Electrochemotherapy with cisplatin: clinical experience in malignant melanoma patients. *Clin Cancer Res* **6**, 863-867.

**Sersa, G., Stabuc, B., Cemazar, M., Miklavcic, D. & Rudolf, Z.** (2000b). Electrochemotherapy with cisplatin: the sistemi antitumour effectiveness of cisplatin can be potentiated locally by the application of electric pilses in the treatment of malignant melanoma skin metastases. *Melanoma Res* **10,** 381-385.

Sersa, G., Cufer, T., Cemazar, M., Rebersek, M. & Zvonimir, R. (2000c). Electrochemotherapy with bleomycin in the treatment of hypernephroma metastasis: case report and literature review. *Tumori* **86**, 163-165.

**Shin Y.S., Cho K. & Kim JK.** (2004). Electrotransfection of Mammalian Cells Using Microchannel-Type Electroporation Chip. *Anal Chem.* **76,** 7045-7052.

Somiari S., Glasspool-Malone J., Drabick Joseph. J., Gilbert Richard A., Heller R., Jaroszeski M. J. & Malone Robert W. (2000). Theory and Vivo Application of Electroporative Gene Delivery. *Molecular Therapy* **2**, 178-187.

**Y.** (1992). Electroporation and electrophoretic DNA transfer into cells. The effect of DNA interaction with electropores. *Biophys J* **63**, 1320-1327.

**Teissie J. & Tols M.P.** (1994). Manipulation of cell cytoskeleton affects the lifetime of cell membrane electropermeabilization. *Ann NY Acad Sci* **720**, 98-110.

Vassanelli S., Bandiera L., Borgo M., Cellere G., Santoni L., Bersani C., Salamon M., Zaccolo M., Lorenzelli L., Girardi S., Maschietto M., Dal Maschio M. & Paccagnella A. (2008). Space and time-resolved gene expression experiments on cultured mammalian cells by a single-cell electroporation microarray. *New Biotechnology* **25**, 55-67.

**Verspohl E.J., Kaiserling-Buddemeier I. & Wienecke A.** (1997). Introducing specific antibodies into electropermeabilized cells is a valuable tool for eliminating specific cell functions. *Cell Biochem Funct* **15,** 127-134.

Wallrapp F. and Fromherz P. (2006).  $TiO_2$  and  $HfO_2$  in electrolyte-oxide-silicon configuration for applications in bioelectronics. *Journal of applied Physics* **99**, 114103-1-10.

**Wells D. J.** (2010). Electroporation and ultrasound enhanced non-viral gene delivery in vitro and in vivo. *Cell Biol Toxicol* **26,** 21-28.

# Ringraziamenti

Vorrei iniziare questa pagina ringraziando il professore Vassanelli ed i suoi collaboratori del laboratorio Stefano, Marta e Alessandra che mi ha permesso di svolgere questo progetto di tesi, che mi hanno aiutato e sostenuto durante quest'ultimo periodo di studi.

Voglio poi ringraziare la mia famiglia che è stata presente in ogni occasione con parole di incoraggiamento e con una grande fiducia in me. Hanno saputo partecipare con gioia ai momenti di successo e con supporto nei momenti più difficili. Grazie.

Non posso non ringraziare tutti i compagni di viaggio in questi anni universitari; vi ringrazio tutti per gli appunti passati, i momenti di studio insieme e gli aperitivi delle quattro del pomeriggio. Ringrazio in particolare Lisa e Marco per il periodo trascorso insieme nelle terre del nord... rimarrà sempre tutto impresso nella mia memoria.

Infine vorrei ringraziare tutti gli amici che mi sono stati vicini in questo periodo: voglio ringraziare coloro che ci sono stati per un caffè, per una birra o per una serata; coloro che si sono ricordati di farmi un in bocca al lupo prima di un esame, coloro che sono stati una valvola di sfogo , coloro che ci sono stati nei momenti più difficili e d'ansia, coloro che mi hanno fatto compagnia nei lunghi viaggi in treno. A voi tutti lascio il grazie più sincero.