



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Ingegneria Industriale DII

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria dei Materiali

**Progettazione e fabbricazione di architetture di
idrogeli e cellule tramite stampanti 3D**

Relatore: Prof.ssa Monica Dettin

Laureando: Alessandro Peretti

Matricola: 1163250

Anno Accademico 2019/2020

*Dedicata a
Nonno Aniello e
a Zia Venerina*

Prefazione

Malattie, infortuni e traumi sono le cause principali di danno e di degradazione di tessuti o organi, che, ogni anno, portano milioni di pazienti a sottoporsi a trattamenti per la loro sostituzione, riparazione e rigenerazione. La carenza di donatori sani e compatibili rende il trapianto una soluzione non sempre valida ed a fronte di questa problematica una nuova scienza interdisciplinare, la “*Tissue Engineering*” (TE), sembrerebbe offrire una promettente e alternativa soluzione. La TE ha lo scopo di sviluppare dei sostituti biologici, *in vitro* o *in vivo*, in grado di ripristinare le funzioni di un tessuto o di un organo danneggiato in parte o nella sua totalità, ponendo le basi per quella che viene definita “*medicina rigenerativa*”.

L’obiettivo che ci si pone, all’interno di questo elaborato, è quello di evidenziare quali siano le fondamenta di questa nuova disciplina, soffermandosi in particolar modo nella trattazione del modello *scaffold-based* e nell’ottenimento di architetture tridimensionali di idrogeli, mediante stampa 3D.

Il presente lavoro è quindi costituito da un capitolo introduttivo all’interno del quale si prefiggono gli obiettivi e si definiscono le caratteristiche e le componenti principali della TE. A seguire si riportano i materiali e i metodi utilizzati e la parte sperimentale, quest’ultima svolta, in parte, presso il laboratorio di Bioingegneria del Dipartimento di Ingegneria Industriale (DII) dell’Università degli studi di Padova e, in parte, presso il *Cell Biology & Tissue Engineering Laboratory* del King’s College di Londra. Infine, si presentano le conclusioni in base ai risultati ottenuti e le prospettive future.

Sommario

Introduzione.....	1
I tessuti Biologici	1
Matrice extracellulare	2
Sistemi cellulari	6
Proteine di adesione e Fattori di crescita	8
Tessuto Cartilagineo	11
Scaffolds: prerequisiti e tecniche di produzione.	14
Scopo della tesi	22
Materiali e Metodi.....	23
Materiali.....	23
Soluzione di Alginato	23
Soluzione reticolante.....	23
Preparazione dei terreni e splitting delle cellule	23
Preparazione soluzioni <i>Live/Dead assay</i>	24
Preparazioni soluzione <i>Alamar Blue assay</i>	24
Preparazione sintesi peptidica.....	24
Strumenti	25
Metodi	26
3D bioprinting	26
Live/Dead assay	27
Prove reologiche	28
Sintesi peptidica su fase solida (SPPS).....	32
Spettroscopia di assorbimento	34
Purificazione e caratterizzazione del peptide.....	35
Analisi di massa	38
Parte sperimentale	41
Sintesi Peptidica	41
Sintesi peptide DAR-16	41
Purificazione del peptide DAR-16.....	47
Architetture tridimensionali a base di idrogeli e cellule.....	49
Coltura cellulare.....	49
Preparazione della soluzione di Alginato e <i>setting-up del bioplotter</i>	51
Preparazione <i>Idrogel</i>	54

Live/Dead test	56
Alamar Blue assay	56
<i>Risultati e discussioni</i>	59
Sintesi e purificazione peptide auto-assemblante DAR-16	59
Preparazione degli <i>scaffolds</i>	63
<i>Conclusioni</i>	71
<i>Bibliografia</i>	I

Introduzione

Si definisce *Tissue Engineering (TE)*, una scienza interdisciplinare che coinvolge l'ingegneria e le scienze naturali nello sviluppo di sostituti biologici in grado di ripristinare, mantenere e *migliorare* le funzioni di un tessuto danneggiato.

Una delle idee di base della TE, e in particolar modo alla base del modello *scaffold-based*, è quella di creare *in vitro* dei tessuti o organi ingegnerizzati partendo dalla semina di cellule specifiche, prelevate dal paziente mediante biopsia, in un sistema di supporto, solitamente polimerico, definito *scaffold*. A tale fine vi è la necessità di riprodurre le condizioni fisiologiche sperimentate delle cellule in una matrice extracellulare (ECM). La TE permette quindi di sintetizzare, *in vitro*, veri e propri tessuti che possono essere impiantati all'interno dell'individuo nel sito danneggiato, o addirittura di rigenerare, *in vivo*, tessuti e/o organi, grazie all'utilizzo di biomateriali biorisorbibili che, degradandosi in modo controllato, supportano la crescita di un nuovo tessuto.

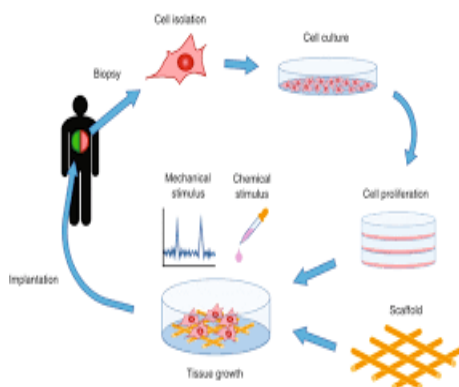


Figura 1 Schema dell'approccio usato nella Tissue Engineering

I tessuti Biologici

I tessuti biologici possono essere considerati dei veri e propri materiali compositi, costituiti da due componenti principali: una vivente legata alla presenza di cellule, e una strutturale denominata matrice extracellulare (ECM). A seconda del numero di cellule,

della tipologia, della modalità di associazione e del tipo di ECM si evidenziano diversi tessuti biologici, classificabili in base a criteri principalmente morfologici, strutturali e funzionali. Si distinguono così quattro classi principali di tessuti:

- Tessuto epiteliale;
- Tessuto connettivo;
- Tessuto muscolare;
- Tessuto nervoso;

È chiaro che, al fine di mimare quanto più possibile il comportamento di un tessuto, è fondamentale conoscerne il ruolo sia a livello biologico che meccanico.

Di seguito e nei prossimi paragrafi, verranno analizzate quindi tutte le componenti costituenti i tessuti come matrice extracellulare, cellule, fattori di adesione e di crescita.

Matrice extracellulare

I tessuti degli organismi viventi, come già detto, non sono costituiti solamente da cellule, ma anche dalla cosiddetta matrice extracellulare, ECM, la cui organizzazione tridimensionale è dovuta alla presenza di un'intricata rete di macromolecole nello spazio extracellulare. L'ECM risulta essere composta da eteropolisaccaridi e proteine fibrose, che, associandosi in un reticolo compatto e connesso alla superficie delle cellule che l'hanno prodotto, forniscono un substrato in grado di stabilizzare la struttura fisica dei tessuti e, allo stesso tempo, di garantire alle cellule l'adesione, la migrazione, la proliferazione e il differenziamento, garantendo quindi la sopravvivenza, la forma e la funzione del tessuto stesso. Questa funzione *attiva* dell'ECM è dovuta alla presenza, nella struttura, di *segnali biochimici* ovvero molecole proteiche in grado di trasmettere informazioni.

Per quanto concerne gli eteropolisaccaridi, questi sono rappresentati da *glicosamminoglicani* (GAGs) e *proteoglicani*. I primi si identificano come una famiglia di polimeri lineari composti da due unità di natura glucidica contenenti, in entrambe le unità, gruppi solforici e carbossilici responsabili dell'elevata carica negativa che i GAGs acquisiscono. La presenza di tale carica fa sì che vi sia un elevato grado di idratazione

nella matrice e permette ai GAGs di formare gel porosi che, oltre a garantire supporto meccanico e resistenza a compressione, permettono la diffusione di molecole idrosolubili e la migrazione cellulare. Un esempio importante di GAG è l'acido ialuronico (HA), il quale è costituito da residui di N-acetil-glucosamina e di acido D-glucorico e viene liberato direttamente dalla superficie cellulare per mezzo di un complesso enzimatico localizzato nella membrana plasmatica. L'HA è coinvolto in processi di riparazione e gioca un ruolo estremamente importante anche nelle articolazioni dove funge da lubrificante. È possibile trovare quindi l'HA nell'umor vitreo dell'occhio, nel liquido sinoviale, nella pelle, nella cartilagine, nei tendini e nelle pareti dell'aorta. Eccezion fatta per l'HA, altri GAG tendono a legarsi con le proteine a formare quelli che sono i proteoglicani. Questi hanno un comportamento ben diverso dai semplici GAG a causa della loro complessità strutturale, che determina inoltre un comportamento viscoelastico dei tessuti connettivi.

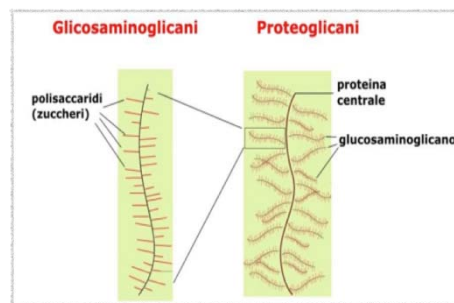


Figura 2 Esempio di struttura GAGs e proteoglicani

Oltre ai polisaccaridi, nella matrice extracellulare sono presenti le proteine fibrose, capaci di fornire consistenza e resistenza meccanica all'intera ECM. Le proteine sono macromolecole costituite dalla condensazione di più amminoacidi attraverso quello che viene denominato *legame peptidico*.

Un amminoacido a sua volta è costituito da un atomo centrale di carbonio a cui è legato un atomo di idrogeno, un gruppo amminico, un gruppo carbossilico e una catena laterale R. Ogni amminoacido si differenzia da un altro proprio in virtù della natura della catena laterale. In genere, risulta essere più corretto parlare di residui di amminoacidi, in quanto

la reazione che porta alla formazione del legame peptidico risulta essere una reazione di policondensazione con relativo rilascio di una molecola di acqua.

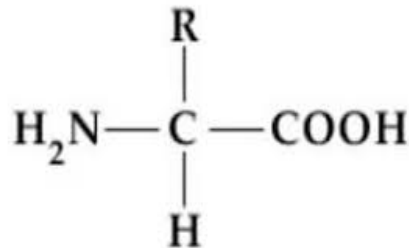


Figura 3 Schema struttura base di un amminoacido dove R varia a seconda del gruppo laterale in catena

Per quanto riguarda le proteine, queste sono in grado di svolgere diverse funzioni biologiche e per tale ragione sono classificate in:

- Proteine catalitiche come gli enzimi;
- Proteine di trasporto come l'emoglobina;
- Proteine di riserva come la caseina;
- Proteine contrattili come la miosina e l'actina;
- Proteine strutturali come il collagene e l'elastina;
- Proteine di difesa come gli anticorpi e la trombina;
- Proteine di regolazione come gli ormoni;

Le proprietà e le funzioni biologiche che le proteine sono in grado di svolgere variano a seconda della loro struttura. In particolar modo, per ciascuna proteina è possibile definire tre diversi livelli di strutturazione e, in taluni casi, è possibile evidenziarne anche un quarto.

Viene definita *struttura primaria* la semplice sequenza di amminoacidi costituenti la proteina. Assume il nome di *struttura secondaria* la particolare organizzazione che assume la struttura primaria a livello locale, come una struttura ad α -elica o la struttura β -sheet. Viene indicato con il termine *struttura terziaria* l'avvolgimento globale che acquista la catena proteica in seguito alle interazioni che si instaurano tra i diversi gruppi

lateral. In alcuni casi, come precedentemente accennato, è possibile definire anche una *struttura quaternaria*, prodotta dalla combinazione di più catene, aventi ciascuna una propria struttura secondaria e terziaria.

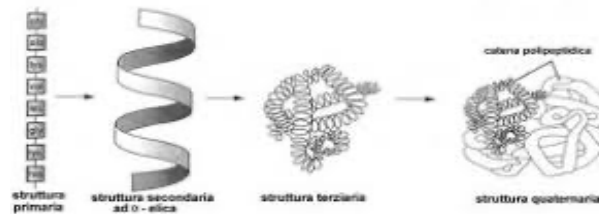


Figura 4 Rappresentazione grafica delle possibili strutture assunte da una catena proteica

Sono le proteine fibrose come collagene ed elastina a conferire la funzione di supporto all'ECM, caratteristica dovuta proprio alla particolare struttura che assumono tali macromolecole. Il collagene, per esempio, presenta una struttura quaternaria ad alta resistenza a trazione, grazie alla presenza di legami crociati tra le diverse catene del precursore, il *tropocollagene*. Analizzandone la struttura, si evince che il precursore del collagene è costituito da tre catene polipeptidiche, ad α -elica, intrecciate tra loro a formare una superelica destrorsa. Il particolare avvolgimento a spirale è legato per lo più alla presenza di una sequenza di amminoacidi che si ripete nella struttura, sequenza di glicina, prolina e idrossiprolina. L'elastina, a differenza del collagene, è caratterizzata da particolari amminoacidi come la desmosina, l'iso-desmosina e la lisino-norleucina che risultano particolarmente importanti per la reticolazione.

Lo scheletro a spirale e i diversi legami reticolari presenti, consentono di comprendere il comportamento elastico di tale proteina. L'elastina è in grado di estendersi sotto un carico assiale di trazione e di recuperare la deformazione una volta cessata la sollecitazione. La presenza combinata di collagene ed elastina, situazione molto frequente in natura, assicura la deformazione di un tessuto evitandone la lacerazione.

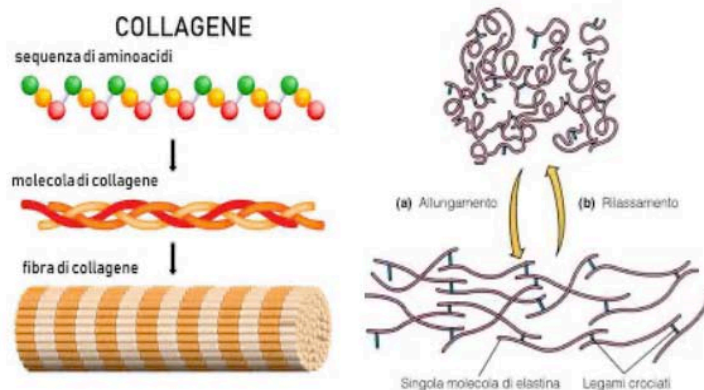


Figura 5 A destra rappresentazione della struttura a tripla elica del tropocollagene e della fibra di collagene. A sinistra schema della struttura raggomitolata dell'elastina in fase di riposo e struttura estesa in seguito a sollecitazione meccanica

Sistemi cellulari

L'organismo umano è costituito da miliardi di unità strutturali chiamate cellule, organizzate tra loro a formare tessuti e organi. Tali unità risultano essere sempre in attività e capaci di respirare, riprodursi, accrescersi, muoversi, di modificare la propria forma in base alla funzione da svolgere e di reagire a particolari stimoli.

Tra gli esseri viventi è possibile identificare due tipologie di organismi: *procarioti* e *eucarioti*.

I primi sono rappresentati da unità strutturali piuttosto semplici, unità all'interno delle quali non vi è nessuna membrana cellulare a separare il materiale genetico dal citoplasma e nessun nucleo, elemento invece identificativo delle cellule eucariotiche. Alla famiglia dei procarioti appartengono i batteri e le alghe.

Le tipiche cellule eucariotiche, invece, sono molto più grandi rispetto alle cellule batteriche, con dimensioni che possono raggiungere anche i 100 μm . Come accennato in precedenza, una caratteristica di queste unità è la presenza di un nucleo in cui viene replicato e conservato il genoma completo. A definire i contorni di una cellula troviamo la membrana cellulare, un'associazione fosfolipidica in grado di separare il contenuto interno della cellula dal mezzo esterno. Oltre al nucleo, all'interno della cellula è presente il citoplasma e altri organuli con diverse funzioni. I diversi organuli, a loro volta, sono suddivisi da membrane a formare compartimenti indipendenti, all'interno dei quali

avvengono reazioni anche incompatibili tra loro, rendendo, per tale ragione, la cellula un'unità dall'elevata complessità funzionale.

Fanno parte degli organuli i mitocondri, i ribosomi, i lisomi, l'apparato di Golgi e il reticolo endoplasmatico.

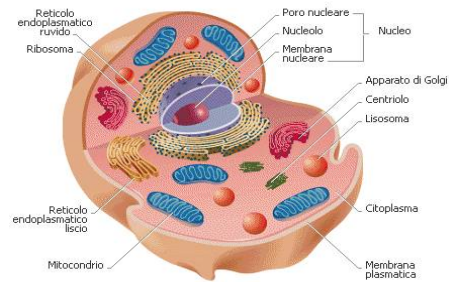


Figura 6 Struttura schematica di una cellula eucariotica

Membrana Cellulare: funzione e composizione

La membrana cellulare è una componente piuttosto importante della cellula. Non solo ha lo scopo di separare il contenuto interno della cellula dal mezzo esterno, ma gioca un ruolo fondamentale anche nella sopravvivenza della cellula stessa. La struttura, nel suo complesso, risulta essere flessibile, dinamica, resistente e capace di autosigillarsi. Grazie a quest'ultima proprietà, la membrana è in grado di fondersi e scindersi senza alcuna perdita di materiale cellulare nel corso dell'intera vita della cellula.

Un'ulteriore caratteristica importante della membrana è la capacità di regolare il passaggio di altre molecole all'interno della cellula e questo avviene in un modo estremamente selettivo. Ne è un esempio la permeabilità altamente selettiva ai soluti polari, la quale consente di regolare la concentrazione ionica all'interno della cellula.

Per quanto concerne la composizione, la membrana è costituita prevalentemente da lipidi e proteine specializzate come enzimi e sistemi di trasporto. La particolare disposizione assunta dai lipidi definisce quello che è considerato il modello a mosaico fluido, modello nel quale le subunità lipidiche e proteiche rappresentano le singole tessere di un mosaico, con la capacità di movimento in seguito a interazioni di tipo non covalente tra lipidi-lipidi e lipidi-proteine. Decisivo nel determinare la struttura della membrana è il ruolo giocato

dai fosfolipidi. Una volta immersi in un mezzo acquoso, questi tendono a disporsi in modo del tutto spontaneo formando un doppio strato con le teste polari e idrofiliche verso l'esterno, ovvero verso l'acqua e le code apolari, e quindi idrofobiche, verso l'interno. Tale disposizione fa sì che le interazioni con le proteine siano specifiche, esponendo domini diversi da un lato e dall'altro della membrana, producendo così due superfici asimmetriche. Il colesterolo infine funge da stabilizzante della struttura, in quanto la sua rigidità permette di mantenere in posizione ordinate i lipidi e le proteine.

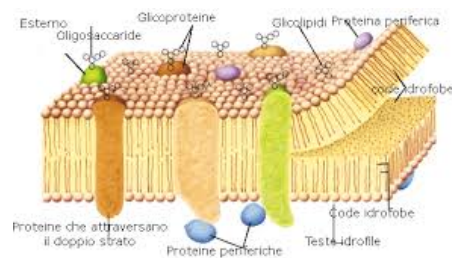


Figura 7 Rappresentazione schematica della composizione di una membrana cellulare

Proteine di adesione e Fattori di crescita

Per produrre un tessuto o un organo è fondamentale che le cellule siano in grado di riconoscersi e di interagire tra di loro e con la ECM. In questo processo l'adesione delle cellule con la matrice è fondamentale, in quanto moltissimi tipi cellulari sono ancoraggio dipendenti, ovvero necessitano di aderire su un substrato per poter sopravvivere. L'adesione può essere mediata da diverse proteine derivanti dalla matrice extracellulare, dal citoscheletro e dai recettori di membrana.

Si presentano di seguito le proteine responsabili dell'adesione cellula-cellula e dell'adesione cellula-matrice, proteine che appartengono alla membrana cellulare e alla matrice.

- *Proteine di adesione della membrana*

Il riconoscimento e l'adesione cellulare sono fenomeni controllati da macromolecole proteiche definite *recettori adesivi*. Fanno parte di questa famiglia le integrine, le caderine e le molecole di adesione conosciute con l'acronimo CAM (*cell adhesion molecules*), quest'ultime appartenenti alla Super Famiglia delle immunoglobuline (Ig SF). Tali recettori adempiono diverse funzioni: costituiscono un sistema di ancoraggio che conferisce stabilità meccanica ai tessuti; permettono la formazione di aggregati cellulari omogenei necessari allo sviluppo di un nuovo tessuto; controllano il differenziamento e la proliferazione cellulare garantendo l'accrescimento del tessuto, sia a livello embrionale sia in fase di guarigione.

Le integrine fanno parte della famiglia di glicoproteine di membrana e fungono da recettori sia per le proteine della ECM sia per quelle di membrana cellulare. Ciascuna integrina è un eterodimero contenente subunità α e subunità β le quali presentano un vasto dominio extracellulare, una zona idrofobica immersa nella membrana e una coda citoplasmatica.

Le subunità α sono caratterizzate dalla presenza, nella porzione amminoternale esposta all'ambiente extracellulare, di tre diversi moduli in grado di legare cationi bivalenti come il Ca^{2+} , cationi indispensabili al legame integrina-proteina (ligando). Estremamente importante per tali molecole è la bassa affinità con i rispettivi legandi con cui si vanno a legare. È proprio questa bassa affinità che permette di avere interazione dinamiche con la matrice, consentendo quindi una migrazione cellulare.

Le caderine sono molecole localizzate nelle *giunzioni di aderenza*, ovvero in siti specializzati per l'adesione cellula-cellula e la loro attività di adesione è fortemente legata alla presenza del catione calcio. La struttura di una caderina è caratterizzata dalla presenza da una regione esterna N-terminale, dominio nel quale si focalizza l'attività di adesione, un segmento transmembrana e una coda C-terminale.

Le Ig SF sono proteine caratterizzate da un lungo tratto extracellulare N-terminale, un segmento elicoidale transmembrana ed una coda citoplasmatica.

L'interazione tra due Ig differenti comporta l'adesione cellula-cellula.

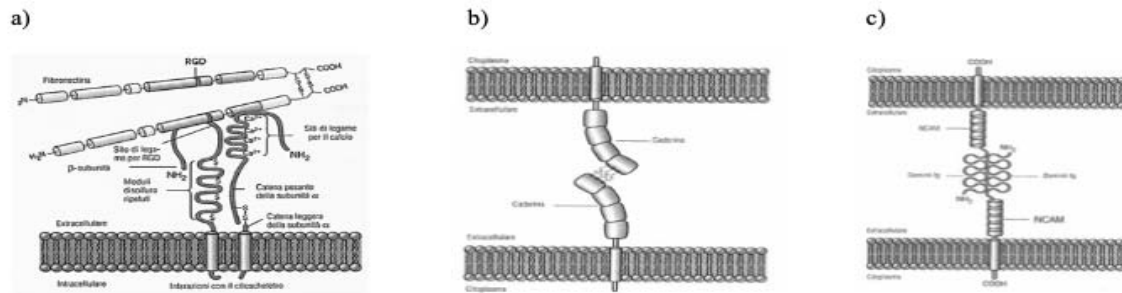


Figura 8 Meccanismi di interazione tra le molecole responsabili dell'adesione: a) integrine; b) caderine; c) Immunoglobuline

- *proteine di adesione della matrice extracellulare*

Come già stato citato più volte, la matrice extracellulare non funge solamente da struttura di sostegno, ma possiede anche un ruolo attivo nel dirigere il comportamento delle cellule nei tessuti. Nell'ECM è possibile individuare delle proteine capaci di permettere l'adesione delle cellule come fibronectina, laminina, tenascina e vitronectina.

La fibronectina è un dimero costituito da due subunità piuttosto simili tra loro, legate a livello dell'estremità C-terminale da un ponte disolfuro. L'attività principale della fibronectina è quella di fare aderire le cellule a tutte le tipologie di ECM, grazie alla presenza di siti specifici ed una elevata affinità per i recettori di superficie cellulare, per il collagene, per i proteoglicani solforati e per la fibrina. La fibronectina, grazie all'interazione con le cellule, influenza la forma e l'organizzazione del loro citoscheletro ed è essenziale durante la migrazione e il differenziamento cellulare, intervenendo anche in quelli che sono i processi di guarigione e di cicatrizzazione di un tessuto favorendo la migrazione di macrofagi e favorendo l'adesione delle piastrine.

La laminina è, invece, una proteina fibrosa anch'essa in grado di svolgere principalmente funzioni adesive. Tale proteina, in genere, presenta una struttura quaternaria frutto dell'interazione di tre catene distinte e che possono combinarsi in molteplici varianti. Tra le diverse combinazioni è possibile individuare un punto in comune, ovvero una struttura quaternaria tridimensionale a forma di croce latina. La particolarità della laminina è che non lega direttamente il collagene, ma si lega indirettamente attraverso il *nidogeno*, molecola il cui sito di legame è presente nella struttura della laminina.

La tenascina è un'altra macromolecola appartenente alla matrice extracellulare responsabile dell'adesione cellulare ed è un complesso di catene polipeptidiche unite da ponti disolfuro. È una proteina presente per lo più nella fase embrionale, nelle ferite in fase di guarigione e nello stroma di alcuni tumori. La presenza della sequenza RGD fa sì che questa proteina sia in grado di legarsi direttamente alle integrine presenti nella membrana cellulare, essendo il motivo peptidico RGD responsabile dell'adesione cellulare con l'ECM.

La vitronectina è una glicoproteina adesiva presente sia in circolo che in differenti tessuti. La sua struttura molecolare è caratterizzata da un elevato contenuto di strutture β -sheet e include numerosi siti di legami tra cui un sito per le integrine, un sito per il collagene, per l'eparina e per il plasminogeno.

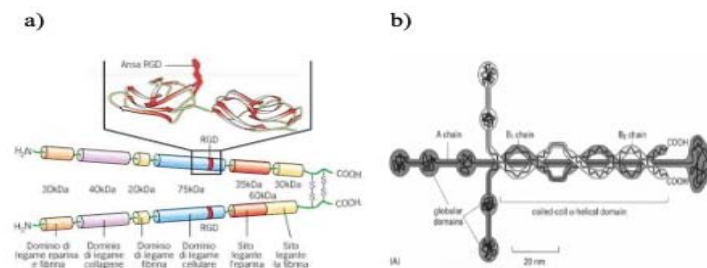


Figura 9 Rappresentazione schematica della struttura della fibronectina (a) e della laminina (b)

Tessuto Cartilagineo

Il tessuto cartilagineo è un tessuto connettivo specializzato dotato di una buona resistenza a compressione ed elasticità. È costituito prevalentemente da una matrice amorfa di fibre e di condrociti posti all'interno di cavità chiamate *lacune* prodottesi con l'aumentare della sostanza intercellulare dovuta all'attività dei condroblasti.

Contrariamente a quanto si osserva negli altri tessuti connettivi, nella cartilagine vi è la totale assenza di vasi e di nervi e la nutrizione avviene per diffusione delle sostanze all'interno della matrice. A ricoprire la superficie del tessuto vi è il *pericondrio*, un rivestimento fibroso e compatto di tessuto connettivo. Man mano che cresce la sostanza

intercellulare, le attività di sintesi e di riproduzione dei condroblasti si fanno sempre meno intense e questi si differenziano in condrociti i quali, all'interno delle lacune, vanno a formare *gruppi isogeni* che producono ulteriore matrice per tutto il periodo di accrescimento della cartilagine definendo quello che viene chiamato *accrescimento interstiziale*.

In prossimità della regione periferica del tessuto, ovvero presso il pericondrio, la morfologia dei condrociti varia, così come varia la loro distribuzione. Si osservano così cellule non più sferoidali, ma cellule appiattite e disperse non più in gruppi isogeni.



Figura 10 Rappresentazione tessuto cartilagineo e sue componenti

A seconda della quantità della sostanza amorfa e di fibre e della natura di quest'ultima, il tessuto cartilagineo può essere classificato in:

- Cartilagine ialina;
- Cartilagine elastica;
- Cartilagine fibrosa;

La cartilagine ialina, in un individuo adulto, rappresenta il tessuto di rivestimento delle articolazioni, forma le cartilagini costali, gli anelli tracheali e le cartilagini bronchiali e del naso. Nell'embrione e nel feto, invece, rappresenta gran parte dello scheletro. A differenza di altri tessuti cartilaginei, la cartilagine ialina si presenta priva di fibre.

Per quanto riguarda la cartilagine elastica, questa si presenta come una maggiore quantità di fibre ed un minore contenuto di proteoglicani che rendono questo tessuto

maggiormente flessibile. Questo tipo di cartilagine forma parte delle cartilagini funzionali al processo vocale, parte del padiglione auricolare e del meato uditivo esterno.

La cartilagine fibrosa, infine, si presenta come un tessuto ricco di fasci di fibre immersi in una scarsa matrice amorfa. Questa cartilagine rappresenta quella che è una fase di transizione tra il tessuto connettivo denso e la cartilagine e la si trova nei dischi intervertebrali e nei vari menischi articolari.

A differenza di altri tipi di tessuto, l'assenza di una rete vascolare, fa sì che nel tessuto cartilagineo vi sia una limitata capacità di autoriparazione in seguito a traumi. I condrociti, nel mantenere l'integrità del tessuto di cui fanno parte, non hanno la necessità di proliferare e, ad eccezione fatta di lesioni a tutto spessore, la struttura della matrice impedisce la migrazione, verso il sito lesionato, di cellule progenitrici o dei condrociti stessi.

Nel corso degli anni, sono state sviluppate diverse tecniche in grado di ripristinare le normali funzioni del tessuto, a partire da tecniche in grado di stimolare processi di rigenerazione intrinseci fino ad arrivare all'uso della TE. Come primo approccio, si è fatto uso di tecniche come le perforazioni subcondrali e le microfratture, le quali favoriscono la migrazione di cellule staminali nel fondo della lesione. Il differenziamento cellulare, in condrociti, manifestato da queste cellule staminali, consente la rigenerazione del tessuto, che, tuttavia evidenzia proprietà fisiche e biologiche inferiori rispetto al tessuto originale. A fronte di questa problematica, la ricerca si è spinta verso approcci più biorigenerativi. Un esempio di ciò è il trapianto autologo, attraverso il quale i condrociti, prelevati mediante biopsia da una zona non soggetta a carico nell'articolazione, vengono inoculati, in sospensione, nella regione lesionata. Pur evidenziando ottimi risultati, il trapianto resta tutt'ora una soluzione non priva di limitazioni importanti, come la forte dipendenza dalla tipologia di lesione mostrata dal paziente e dalla sua età, oltre a limitazioni riguardanti l'eccessiva invasività dell'intervento chirurgico. A fronte delle limitazioni presentate dal trapianto autologo, una nuova tecnica di stampa biologica permette la ricostruzione del tessuto danneggiato attraverso processi CAD/CAM, dando vita alla cosiddetta *medicina rigenerativa*. Ne sono un esempio i pazienti sottoposti a rinoplastica per il rimodellamento del naso. In questo caso, attraverso l'utilizzo di software in grado di simulare l'intervento viene ricostruita la forma nasale. Processi CAD/CAM permettono il design, la conversione a codice macchina e l'elaborazione

mediante stampa, ottenendo manufatti, di diversi materiali a seconda del tessuto da ripristinare, con un margine di errore minimizzato.

Scaffolds: prerequisiti e tecniche di produzione.

Uno *scaffold* si può definire come una struttura di supporto in grado di favorire, grazie all'ausilio di cellule e di un terreno di coltura, lo sviluppo di tessuti funzionali.

A seconda del tipo di tessuto che dovrebbe essere mimato, l'ingegnerizzazione dello *scaffold* deve tenere in considerazione alcuni aspetti fondamentali come la biocompatibilità, la biodegradabilità, l'architettura del supporto e le proprietà meccaniche.

Senza dubbio uno degli aspetti più rilevanti da tenere in esame è la biocompatibilità, in quanto il costruito ingegnerizzato deve essere in grado di convivere con l'ambiente biologico senza interferire in modo dannoso con la normale attività biologica. La ricerca di veri e propri sostituti momentanei, inoltre, spinge all'utilizzo di materiali biodegradabili e in particolar modo biorisorbibili, ovvero materiali che siano in grado di subire una progressiva degradazione senza provocare una reazione avversa nell'organismo, permettendo quindi di sostituire il supporto impiantato con un tessuto rigenerato. Lo *scaffold* deve possedere, inoltre, capacità fisiche e chimiche in grado di garantire l'adesione, la migrazione, la proliferazione e il differenziamento delle cellule e la conseguente formazione di una nuova matrice extracellulare. A tale fine, gli *scaffolds* devono essere porosi e permeabili in grado quindi di permettere la migrazione delle cellule e l'ingresso dei nutrienti necessari. Le proprietà meccaniche e l'architettura degli *scaffolds* sono altrettanto importanti in quanto, come già detto in precedenza, ogni tipo di tessuto richiede una particolare morfologia ed una certa resistenza per compiere con successo le funzioni per cui predisposto.

Senza dubbio, la scelta del materiale è una fase fondamentale della progettazione e ne determina il successo del supporto, in quanto la struttura superficiale e la chimica dello *scaffold* possono interferire, anche con un profondo impatto, sull'attività cellulare circostante.

Per quanto concerne la natura dei biomateriali, possiamo distinguere due macro-categorie: biomateriali naturali e biomateriali sintetici. Nella prima categoria rientrano i

materiali di origine proteica come il collagene, la fibrina e la seta oltre ai materiali di origine polisaccaridica come l'acido ialuronico, l'alginato e il chitosano. Nei materiali sintetici invece si evidenziano due sottocategorie come biomateriali polimerici come il PEG, il PGA e il PCL e biomateriali ceramici come l'alluminia, la zirconia, l'idrossiapatite e vetri bioattivi.

Per quanto riguarda la fabbricazione vera e propria del supporto per la TE, si riportano di seguito alcune tecnologie utilizzate, ponendo maggiormente dettaglio alla tecnica di *3D-Bioprinting* e la formazione di idrogeli.

- *Solvent-casting particulate-leaching*

Attraverso questa tecnica è possibile ricavare un supporto poroso a partire da una soluzione polimerica. In particolar modo viene sciolto il polimero all'interno di un solvente al quale vengono aggiunte particelle minerali (ad esempio di NaCl) di una specifica dimensione per formare una sospensione uniforme. L'evaporazione del solvente conduce, quindi, all'ottenimento di un supporto arricchito con particelle di sale le quali vengono poi rimosse immergendo il composito in acqua, lasciando quindi dei pori nella struttura.

- *Phase separation*

Questa tecnica prevede l'ottenimento di un supporto poroso a partire dalla separazione in due fasi diverse di una soluzione polimerica. Si parla, in questo caso, di una separazione che avviene per via termodinamica e che conduce, quindi, alla separazione della soluzione iniziale in una soluzione contenente una fase ricca di polimero, che può essere inoltre arricchito con molecole bioattive, e una fase ricca di solvente successivamente eliminato per sublimazione.

- *Injection moulding*

Tale tecnica consente di ricavare supporti tridimensionali porosi utilizzando la classica tecnica di *injection moulding* con l'utilizzo contemporaneo di un agente espandente allo

stato solido. L'utilizzo di quest'ultimo agente, a seguito della sua degradazione, consente la produzione di uno *scaffold* dal cuore poroso e dalle superfici esterne compatte, promettendo buone proprietà meccaniche.

- *Freeze drying*

Il *freeze drying* prevede la formazione del supporto poroso a partire dalla preparazione di una soluzione polimerica. Questa viene preparata e raffreddata fino a basse temperature, ad esempio mediante l'uso di azoto liquido e la separazione del solvente avviene per sublimazione attraverso il processo di liofilizzazione.

- *Electrospinning*

Attraverso il processo di *Electrospinning* è possibile ottenere supporti tridimensionali fibrosi facendo uso di un collettore, una pompa per siringhe e di un generatore di alta tensione. In questa tecnica la soluzione, fuoriuscita dalla siringa, viene quindi collezionata sul collettore mediante l'azione di forze elettrostatiche generate proprio dalla presenza di un campo elettrico. Nel processo si ha l'evaporazione del solvente e la solidificazione del getto in nanofibre.

- *Hydrogel*

Nella TE, gli idrogeli possono rappresentare sistemi di *drug delivery* o per la produzione di veri e propri *scaffolds* tridimensionali. Gli idrogeli possono essere considerati dei materiali biocompatibili, in quanto possiedono una struttura molto simile a quella basata su macromolecole descritte per un essere vivente e in particolar modo si identificano in funzione della loro origine naturale o sintetica. Lo sviluppo di idrogeli di natura sintetica nasce principalmente dalle necessità di modificare la struttura dei polimeri naturali per ovviare le limitazioni presenti nella produzione di un gel naturale. L'ottenimento di idrogel a partire da base sintetica, tuttavia, porta a qualche restrizione dovuta alla biocompatibilità del materiale stesso.

In fase di design dell'idrogel è fondamentale conoscerne le proprietà meccaniche in modo tale che il gel possa fare spazio per lo sviluppo di un nuovo tessuto. Le proprietà meccaniche dipendono principalmente da quella che è l'originaria rigidità delle catene polimeriche, dal tipo di molecole di *cross-linking* e dal rigonfiamento, funzione del bilanciamento tra idrofilicità e idrofobicità. Fondamentale inoltre per la TE, è il controllo sulla degradazione del gel, degradazione che può avvenire per idrolisi, per azione di enzimi o per dissoluzione. Ulteriore parametro da tenere in considerazione nella progettazione è l'interazione tra le cellule e il gel stesso.

Per quanto riguarda la fabbricazione di idrogeli naturali, si può fare utilizzo di materiali come collagene, fibrina, ialuronati e derivati da piante e alghe come l'alginato. Proprio su quest'ultimo si pone l'attenzione in questo elaborato.

L'alginato è ben noto come biomateriale utilizzato nel *drug delivery* e nella TE per via della sua biocompatibilità, per la bassa tossicità, per il suo basso costo e per la semplicità con la quale è possibile ottenere gel attraverso l'uso di cationi come il Ca^{2+} .

Nonostante ciò, l'utilizzo dell'alginato nella TE presenta anche degli svantaggi piuttosto rilevanti. La presenza del solo alginato non garantisce la stabilità necessaria a mantenere una struttura, in quanto va incontro a una degradazione incontrollata ed imprevista, a causa della perdita di ioni con conseguente dissoluzione all'interno di un terreno di coltura. Vi è la necessità, quindi, di reticolare il gel di alginato al fine di conservarne la stabilità fisica e meccanica.

- *Self-Assembling Peptides* (SAP)

Un'ulteriore tecnica per la produzione degli *scaffolds* per la T.E. vede l'utilizzo di quelli che vengono comunemente chiamati *peptidi auto-assemblanti* (SAP).

L'utilizzo di queste macromolecole permette di ottenere strutture che, in condizioni di equilibrio termodinamico, risultano essere stabili, a causa dell'instaurarsi di numerose interazioni non covalenti, come interazioni di Van der Waals o legami ad idrogeno.

Visto l'ampia gamma di peptidi auto-assemblanti, quest'ultimi sono stati scomposti in differenti classi ciascuna con caratteristiche particolari. Si trovano, quindi, SAP di:

- Tipo I, denominati peptidi *lego molecolari*. Sono peptidi che organizzandosi in strutture stabili, vanno a formare idrogeli per la produzione di *scaffolds*;
- Tipo II, denominati *interruttori molecolari*;
- Tipo III, denominati *uncini molecolari*. Sono peptidi che permettono di trattare le superfici di materiali, funzionalizzandole e modificandone le proprietà fisiche, chimiche e biologiche. Sono peptidi che rendono, quindi, biologicamente attiva una superficie;
- Tipo IV, denominati *capsule molecolari*, utilizzati per il trasporto di geni e proteine;
- Tipo V, denominati *cavità molecolari* per l'utilizzo nella biomineralizzazione;

In questo lavoro di tesi, si è fatto uso di un peptide auto-assemblante del Tipo I, in particolar modo del peptide DAR-16. La particolarità di questo gruppo viene evidenziata dalle caratteristiche degli amminoacidi in sequenza, ovvero dall'alternanza di amminoacidi (residui) con carica positiva (Arginina, R) e negativa (Acido Aspartico, D), intervallati da residui idrofobici (Alanina, A).

I peptidi appartenenti a questa classe, posti in soluzione fisiologica, vanno a formare una struttura a β -*sheet*, in cui ciascun piano presenta una faccia a carattere ionico, dovuto alla presenza di catene laterali cariche negativamente e positivamente e una faccia a carattere idrofobico. Con le particolari interazioni che si vengono a formare tra le facce cariche e quelle idrofobiche, si vengono a formare strutture tridimensionali in grado di contenere fino al 99,9% di acqua, formando così un idrogel.

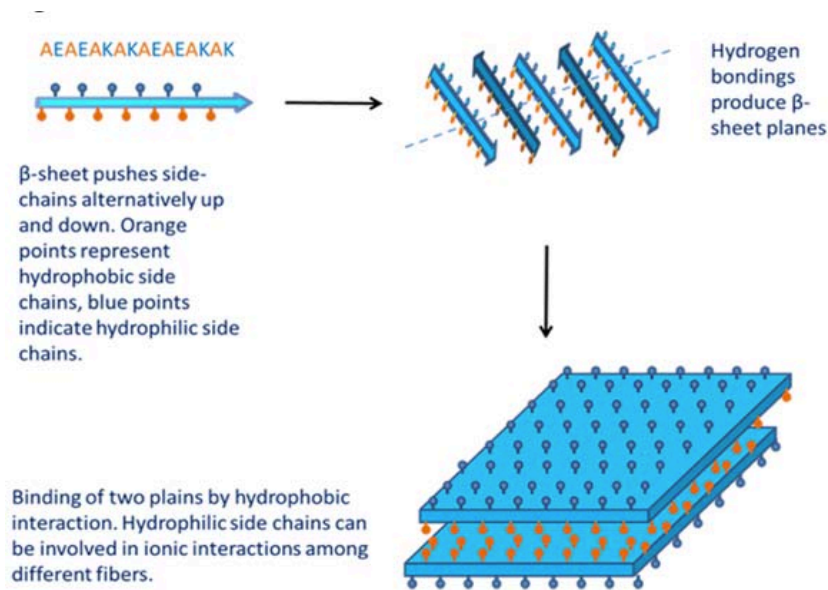


Figura 11 Schema della formazione di una struttura a foglietti a seguito dell'auto-assemblamento di un peptide del Tipo I. In questo caso si rappresenta la struttura assunta dal peptide EAK studiato da Zhang S., nel 1989.

- 3D bioprinting

Al fine della produzione di *scaffolds* adatti agli scopi della medicina rigenerativa, nelle ultime decadi, è stata sviluppata una nuova tecnologia capace di progettare e fabbricare architetture tridimensionali funzionali mediante deposizione *layer by layer* di biomateriali e cellule. Questa particolare tecnica prende il nome di 3D *Bioprinting*.

Una delle sfide centrali di tale applicazione è la riproduzione della microarchitettura che caratterizza l'ECM con sufficiente risoluzione da garantire le funzioni biologiche. Al fine della produzione della struttura è possibile distinguere tre diversi approcci di deposizione del materiale:

- *Inkjet printing*;
- Micro-estrazione;
- *Laser-assisted printing*;

La prima, nota anche come *drop on demand printer*, rappresenta la forma più diffusa di stampa sia per applicazioni biologiche che non. In questo caso si ha la deposizione controllata di un volume di liquido in una posizione specifica. Il principio di

funzionamento prevede il riscaldamento della testa della stampante in modo tale che si venga a generare un impulso di pressione, il quale forza l'uscita di una goccia del materiale dalla punta dell'ago. Diversi studi hanno dimostrato che il riscaldamento in un *range* di 200-300°C non comporta alcun danno potenziale sulla stabilità delle molecole biologiche, sulla *viability* o sull'attività delle cellule dopo stampa. Questo perché, nonostante l'altissima temperatura, la velocità del processo (2 μ s) porta ad un incremento della temperatura della testa della stampante di soli 4-10°C. Oltre alla velocità di processo, l'*Inkjet printing* evidenzia diversi vantaggi come basso costo e ampia disponibilità di cellule vitali dopo stampa. Nonostante ciò, è necessario sottolineare che l'*inkjet printing* presenta limitazioni importanti.

Vi è la necessità, infatti, di utilizzare campioni allo stato liquido capaci di formare poi una struttura 3D con una determinata organizzazione e funzionalità. La viscosità, inoltre, deve garantire che la forza richiesta per espellere la goccia non sia eccessiva, cosa che si osserverebbe con soluzioni ad alta viscosità. A fronte di questi limiti si usano soluzioni che presentano una viscosità ideale di 10 centipoise e soluzioni che possono essere *cross-linkate* per via chimica o UV. Risulta chiaro però che alcuni di questi meccanismi di reticolazione possano risultare dannosi e tossici per le cellule, diminuendo quindi la disponibilità delle cellule e la loro vitalità. Altra limitazione importante è legata alla difficoltà di ottenere una buona densità di cellule. Spesso è necessario utilizzare una bassa concentrazione di cellule per evitare l'intasamento dell'ugello dal quale fuoriesce la soluzione e per ridurre lo *shear stress* che verrebbe prodotto sulle cellule. Un'elevata concentrazione di cellule, inoltre, potrebbe interferire negativamente su quelli che sono i meccanismi di reticolazione.

La stampa per microestrusione, a differenza dell'*Inkjet printing*, prevede la fuoriuscita tramite estrusione di un getto di soluzione continuo e controllato. Per tale scopo, la tecnica più comune per estrarre la soluzione è quella di utilizzare un sistema pneumatico o meccanico come un sistema a pistone o a vite. Con questa tecnica è possibile stampare diverse soluzioni, con viscosità che variano dai 30 a 6×10^7 centipoise, che possono essere reticolate termicamente e che possiedono la capacità di evidenziare il fenomeno di *shear thinning*. Le soluzioni più viscosi garantiscono la produzione di veri e propri supporti tridimensionali mentre le soluzioni a viscosità più bassa evidenziano maggiore propensione a mantenere la disponibilità delle cellule all'interno. Fondamentale è il ruolo

giocato dal comportamento Non-Newtoniano della soluzione in quanto, in prossimità dell'uscita dell'estrusore, si ha una diminuzione della viscosità con l'aumentare dello sforzo tangenziale.

Il vantaggio maggiore nell'utilizzare tale tecnica viene evidenziato dalla capacità di depositare materiali ad elevata densità cellulare, obiettivo principale nella ingegnerizzazione di organi mediante stampa biologica. In un confronto con l'*inkjet printing* è possibile, tuttavia, evidenziare il più grosso svantaggio della stampa mediante microestrusione. Lo sforzo tangenziale generatosi in prossimità dell'estremità dell'estrusore conduce, difatti, ad una considerevole diminuzione della disponibilità di cellule, disponibilità che scende addirittura fino al 40% dopo la stampa.

Meno comune è la tecnica *laser-assisted Bioprinting* (LAB). Un tipico dispositivo LAB è costituito da un laser pulsato, un sistema di lenti, un supporto (genericamente di vetro) rivestito con uno strato in grado di assorbire l'energia del laser, oro o titanio per esempio, ed uno strato di materiale biologico in soluzione come può essere un idrogel. Il suo funzionamento prevede, quindi, la focalizzazione del fascio laser sullo strato assorbente a generare bolle, le quali spingono il materiale contenente la componente biologica sul collettore sottostante. Con questa tecnica, vista l'assenza di un ago, si risolve uno degli aspetti critici legato alle tecniche precedentemente descritte, ovvero l'intasamento della punta e eccessivo *shear stress* sulle cellule. Tuttavia, anche il LAB presenta alcuni svantaggi come, per esempio la necessità di avere soluzioni con una cinetica di gelificazione elevata e la difficoltà di depositare le cellule con precisione in specifiche posizioni.

Nel suo complesso la stampa biologica 3D può essere utilizzata per la rigenerazione, *in situ*, di pelle funzionalizzata e di cartilagine, la produzione di diversi tessuti, come ad esempio valvole aortiche e modelli tumorali.

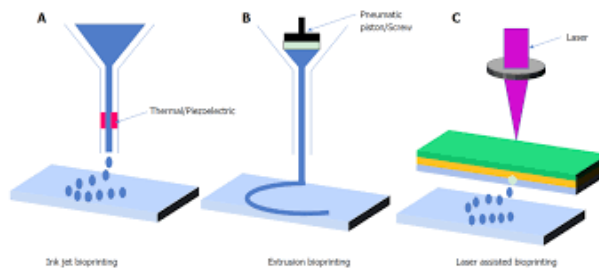


Figura 12 Rappresentazione schematica delle diverse tecniche di 3D Bioprinting.

Scopo della tesi

L'obiettivo che ci si pone in questo progetto di tesi è quello di individuare una tecnica di produzione di un *bioink*, con lo scopo di progettare e fabbricare degli *scaffold* per la TE. A tale scopo verrà utilizzata in primo luogo, una soluzione di Alginato arricchita di cellule. Verranno misurati diversi parametri fondamentali per il processo come il range di viscosità della soluzione e la vitalità delle cellule prima e dopo il processo di stampa. Seguirà la valutazione dell'effetto dell'arricchimento con un peptide auto-assemblante del campione di idrogel sulla attività cellulare in termini di vitalità e proliferazione.

Materiali e Metodi

Vengono elencati di seguito i diversi materiali usati sia per la parte ingegneristica che nella parte biologica che hanno consentito di ottenere uno *scaffold* tridimensionale.

Materiali

Soluzione di Alginato

- Alginic acid sodium salt, very low viscosity powder (A18565) (*Alfa Aesar*);
- Alginic acid sodium salt, high viscosity (J61887) (*Alfa Aesar*);
- Ultrapure (Type 1) water (18.2 M Ω .cm);

Soluzione reticolante

- Calcium Chloride PM=110,98 g/mol;
- Ultrapure (Type 1) water (18.2 M Ω .cm);

Preparazione dei terreni e splitting delle cellule

- Dulbecco's Modified Eagle's Medium – High glucose (+o- phenol red) (*Sigma 6429*);
- HEPES Buffur1M (*Sigma H0887*);
- L-glutamine 200 mM (*Sigma G7513*);
- Penicillin/Streptomycin (*Sigma P0781*);
- Fetal Bovin Serum "FCS" (*Sigma F9665*);
- Ascorbate powder (*Sigma A4544*);
- Dulbecco's Phosphate Buffered Saline modified without Calcium Chloride and Magnesium Chloride (PBS);
- Trypsin 100x;

- Virkon;

Preparazione soluzioni *Live/Dead assay*

- Ethidium Homodimer-1 (EthD-1) 2 mM (*Invitrogen, Thermofisher Scientific*);
- Calcein AM 4mM (*Invitrogen, Thermofisher Scientific*);

Preparazioni soluzione *Alamar Blue assay*

- Kit soluzione *Alamar Blue* (*Invitrogen, Thermofisher Scientific*);

Preparazione sintesi peptidica

- Ethanol (*Millipore Corporation*);
- Acetone (*VWR chemicals*);
- Methanol (*Sigma-Aldrich*);
- *N*-Methyl-2-pyrrolidone (NMP) (*Sigma-Aldrich*);
- Acetonitrile (*Sigma-Aldrich*);
- Dimethylformamide (DMF) (*Sigma-Aldrich*);
- 2-[(2-Hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)ethyl)amino]ethanesulfonic acid, N-[Tris(hydroxymethyl)methyl]-2-aminoethanesulfonic acid (TES) (*Sigma-Aldrich*);
- Piperidine (*Biosolve*);
- Diethyl Ether (*Biosolve*);
- Dichloromethane (*Biosolve*);
- Trifluoroacetic acid (*Biosolve*);
- *N,N*-Diisopropylethylamine (*Biosolve*);
- Rink amide mbha resin (*Novabiochem*);
- (2-(1*H*-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HBTU) (*Novabiochem*);
- Ethyl cyano hydroxyiminoacetate (Oxyma pure) (*Novabiochem*);

- [Ethyl cyano (hydroxyimino) acetato-O2] tri-1-pyrrolidinylphosphonium hexafluorophosphate (PyOxim) (*Novabiochem*);

Strumenti

A seguire si elencano gli strumenti utilizzati presso i laboratori di bioingegneria dell'Università degli studi di Padova e di *Cell Culture & Tissue Engineering* del King's College di Londra.

- Distillatore d'acqua, Stuart D4000 (*Norrscope*);
- Sistema di purificazione dell'acqua, Milli-Q (UltraPure) (*Merck KgaA*);
- Sintetizzatore automatico, Syro I (*MultysinTech*);
- Spettrofotometro UV-Vis, Lambda 2 (*Perkin Elmer*);
- Liofilizzatore, FreeZone 2.5 Liter Benchtop (*Labconco*);
- Evaporatore rotante, Laborator 4000 Efficient (*Heidolph instruments*);
- Essiccatore sottovuoto (*Kartell Labware*);
- Sistema RP-HPLC semi-preparativa:
 - o Sistema di pompaggio, Waters 600E (*Waters Corporation*);
 - o Rivelatore UV-Vis a lunghezza d'onda programmabile, Waters 2487 (*Waters Corporation*);
 - o Registratore su carta, BD40/BD41 (*Carlo Erba strumentazione/Kipp & Zonen*);
- Sistema RP-HPLC analitica:
 - o Pompa binaria HPLC, Waters 1525 (*Waters Corporation*);
 - o Autocampionatore, Waters 2707 (*Waters Corporation*);
 - o Rivelatore UV-Vis a lunghezza d'onda programmabile, Waters 2489 (*Waters Corporation*);
 - o Computer dotato di software Empower Pro, in grado di elaborare il segnale trasmesso (*Waters Corporation*);
- Centrifughe ALC, PK120 - PK121R - PK131R (*Jencons-PLS*);
- Microscopio ottico, Primo Vert (*Zeuss*);
- Stampante 3D, Rokit INVIVO (*Rokit*);

- Stampante 3D, Regemat 3D V1 (*Regemat*);

Metodi

3D bioprinting

Malattie e traumi possono provocare danni ingenti a tessuti e organi, necessitando interventi per la riparazione e la sostituzione. Ad oggi, il trapianto di organi, da un individuo ad un altro, è una procedura medica efficace, ma, senza dubbio, non priva di limitazioni legate alla possibilità di rigetto.

A fronte di queste limitazioni, numerosi scienziati in tutto il mondo hanno sviluppato tecnologie capaci di produrre organi artificiali in grado di riparare o sostituire gli organi danneggiati. Una di queste tecniche è la stampa tridimensionale biologica.

La stampa 3D biologica è un processo in grado di creare dei modelli cellulari in spazi confinati, dove la funzionalità delle cellule, così come la loro vitalità, viene preservata all'interno di un costrutto stampato. Con la stampa 3D biologica è estremamente necessario replicare quanto più possibile le proprietà morfologiche, fisiche, chimiche e biologiche dei tessuti nativi e per far ciò, l'utilizzo di *bioinks* polimerici e di un grosso numero di cellule rappresentano la chiave dell'intero processo.

Al fine della riproduzione di un organo con successo, è necessario prestare attenzione alle diverse fasi dell'intero processo che si possono dividere in:

- Fase di *design*;
- Fase di preparazione del *bioink*;
- Fase di processo di stampa;
- Fase di maturazione post-stampa;

In fase di *design* è fondamentale progettare ogni singolo organo in funzione del tipo di cellule necessarie, del tipo di componenti polimeriche da utilizzare, dei fattori di crescita e dell'architettura della struttura. In particolar modo è strettamente importante tenere in considerazione la rete vascolare dell'organo. L'utilizzo di *software* CAD, aiutano la progettazione e guidano i processi di stampa tridimensionale.

La preparazione del *bioink* è un aspetto importante da considerare, soprattutto per quanto riguarda le caratteristiche di tali soluzioni, in termini di viscosità, cinetica di gelificazione e proprietà reologiche. Gioca un ruolo importante per ogni singolo organo, la scelta del *bioink* e la tipologia di cellule, al fine di ottenere proprietà biologiche desiderate.

Le proprietà di solidificazione della soluzione ad una certa temperatura vanno ad incidere sulla capacità del gel di possedere una certa integrità strutturale e di facilitare la vitalità delle cellule. Il mantenimento di tale integrità può essere favorito tramite l'azione di una reticolazione chimica, prima, durante, o dopo la stampa.

La densità cellulare influisce notevolmente durante il processo poiché va a definire l'attività biologica dei tessuti in funzione alla comunicazione tra le diverse cellule e tra le cellule e l'ambiente circostante. Dopo stampa, avviene la maturazione del tessuto prodotto, mediante l'uso di bioreattori.

Al fine della produzione di *scaffolds* biologici, in questo progetto, la stampa è avvenuta mediante microestrusione. Il processo vede, quindi, il design del supporto tramite programma CAD (Fusion 360), la conversione del progetto in codice G e l'estrusione del *bioink* tramite un sistema meccanico costituito da siringa e pistone.

Live/Dead assay

Il *live and dead assay* è un metodo di analisi che permette di individuare simultaneamente la presenza di cellule vive e morte, mediante l'utilizzo di due agenti fluorogenici quali la Calceina AM e l'omodimero di Etidio.

Questo saggio risulta essere molto importante nel determinare la vitalità delle cellule e nel monitorare la citotossicità frutto delle interazioni tra le cellule e l'ambiente (o interazioni con agenti citotossici). La misura della vitalità cellulare è basata principalmente sull'integrità della membrana. Difatti, cellule che possiedono una membrana integra vengono considerate cellule *vive* e queste si distinguono dall'emissione di un'uniforme fluorescenza verde, a seguito di un'idrolisi enzimatica della Calceina AM (eccitazione ed emissione rispettivamente a 495/515 nm). Contrariamente, vengono considerate *morte*, cellule che vedono una membrana danneggiata e la perdita della struttura cellulare, del contenuto intracellulare, e del gradiente ionico (discusso nel capitolo introduttivo). Tali cellule si distinguono da una colorazione rossa, frutto di una

fluorescenza derivante da acidi nucleici colorati con l'omodimero di Etidio (eccitazione ed emissione rispettivamente a 528/617 nm). Nelle analisi, è possibile individuare anche cellule che presentano una condizione intermedia, ovvero cellule che risultano essere *morenti*. Tali cellule di norma non vengono considerate come cellule vive in quanto non possono essere coltivate a seguito della loro incapacità di riproduzione.

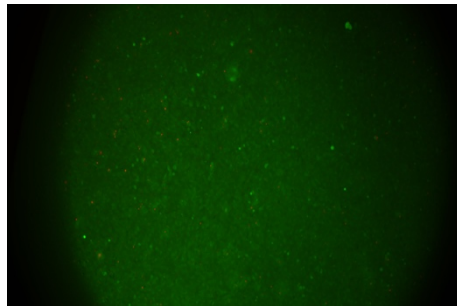


Figura 13 Immagine secondo analisi Live/Dead di cellule NHAC ottenuta mediante microscopio a fluorescenza

Prove reologiche

Si definisce reologia, la scienza che studia gli equilibri raggiunti dalla materia che fluisce o si deforma a seguito di una sollecitazione. Per sistemi liquidi o semisolidi, la reologia studia il flusso, inteso come lo scorrimento di un materiale, i cui gli elementi adiacenti che lo costituiscono si muovono in maniera relativa gli uni sugli altri. Per sistemi solidi, la reologia studia la deformazione di un corpo, ovvero un qualsiasi cambiamento della sua configurazione geometrica che si traduce in un cambiamento di forma. Negli studi reologici di un qualsiasi sistema (liquido, solido o viscolastico) è essenziale considerare la forza necessaria a deformare il materiale o necessaria allo scorrimento. La forza, in gioco, viene convertita in *stress*, misurato quindi in PA.

I gel, da un punto di vista pratico, rientrano in quei sistemi che vengono definiti *liquid-like*, ossia sistemi che scorrono in seguito all'applicazione di una sollecitazione.

Lo studio di questi sistemi può essere condotto con l'utilizzo di uno o più metodi, i quali conducono alla misurazione di parametri quali la viscosità (curve di flusso) o parametri

viscoelastici (test in oscillazione). Al fine di studiarne il comportamento, è possibile quindi utilizzare differenti strumenti quali:

- Viscosimetri capillari;
- Viscosimetri rotazionali;
- Reometri rotazionali;

In questo lavoro di tesi, si è fatto uso di un reometro rotazionale fornito dalla *TA Instruments*, il quale, attraverso l'azione di un motore, genera un momento torcente in grado di stressare il campione.

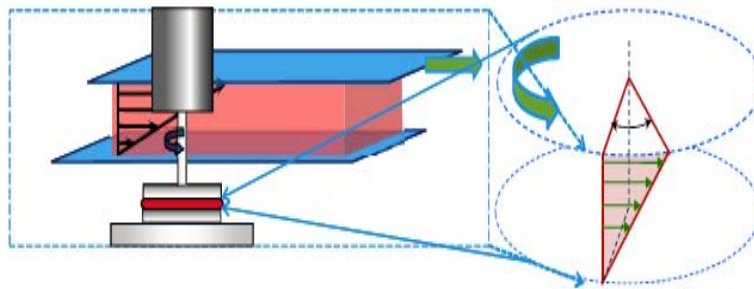


Figura 14 Rappresentazione della sollecitazione generata dal momento torcente, fornito dal motore.

Tali strumenti possono essere classificati in:

- Strumenti a controllo di stress, se sono in grado di misurare lo *shear rate* provocato da una sollecitazione di taglio;
- Strumenti a controllo di *strain*, se sono in grado di misurare lo stress raggiunto a seguito di una deformazione del campione;

Un ulteriore aspetto importante di un reometro rotazionale è la geometria. Possono essere utilizzate geometrie differenti come geometrie a cilindri concentrici, a cono-piatto, a piatto-piatto e geometrie per la torsione.



Figura 15 Rappresentazione delle diverse geometrie disponibili per un reometro rotazionale

Le diverse geometrie vengono prese in esame nel momento in cui si applica la conversione dei parametri macchina (momenti angolare, velocità angolare e spostamento angolare) in parametri reologici (stress, viscosità, modulo tangenziale), mediante l'uso di costanti.

La conversione dei parametri macchina in viscosità avviene, difatti, secondo la relazione:

$$\eta = \frac{\sigma}{\dot{\gamma}} = \frac{M \cdot K_{\sigma}}{\Omega \cdot K_{\gamma}} \quad (1)$$

Ove:

- η è la viscosità [Pa·sec];
- σ è lo stress in [Pa];
- $\dot{\gamma}$ è lo *shear rate* in [sec^{-1}];
- M è il momento torcente;
- Ω è la velocità angolare;
- K_{σ} e K_{γ} sono i fattori di conversione rispettivamente per lo stress e per lo *shear rate*;

In modo del tutto analogo si ha la conversione dei parametri macchina in un ulteriore parametro reologico, quale il modulo tangenziale.

$$G = \frac{\sigma}{\gamma} = \frac{M \cdot K_{\sigma}}{\theta \cdot K_{\gamma}} \quad (2)$$

Ove:

- G è appunto il modulo tangenziale [Pa];
- σ è lo stress in [Pa];
- γ è la deformazione [adm];
- M è il momento angolare;
- θ è lo spostamento angolare;

Come precedentemente accennato, le due costanti K_{σ} e K_{γ} sono funzione della geometria utilizzata. In questo progetto, in particolar modo, si è fatto uso di una geometria a piatti paralleli tra loro le cui costanti sono calcolate mediante le relazioni:

$$K_{\sigma} = \frac{2}{\pi \cdot R^3} \quad (3)$$

$$K_{\gamma} = \frac{R}{h} \quad (4)$$

Ove:

- R è il raggio del piatto in [m];
- h è la distanza tra il piatto superiore e quello inferiore in [m];

Sintesi peptidica su fase solida (SPPS)

Con il termine sintesi peptidica si vuole intendere il processo che conduce alla formazione di un peptide sintetico, attraverso la combinazione, per condensazione, di più amminoacidi in sequenza.

Pur trattandosi della formazione di un solo tipo di legame, ovvero quello ammidico, la sintesi peptidica risulta essere un processo piuttosto complesso. Alla base di tale complessità vi è la necessità di proteggere i gruppi funzionali in catena, i quali non dovrebbero reagire nel corso della reazione che porta alla formazione del legame peptidico. A fronte di ciò, vi è la necessità di utilizzare dei gruppi protettori, i quali, a loro volta, devono essere scelti in base al tipo di reazione necessaria per la loro rimozione, senza andare a compromettere la natura del peptide.

La sintesi può avvenire in due modi: sintesi peptidica in soluzione e sintesi peptidica in fase solida (SPPS). La prima evidenzia una grossa limitazione, ovvero la necessità di eseguire la purificazione e l'isolamento ad ogni ciclo di reazione, prima di proseguire con i cicli successivi. La SPPS, invece, sfrutta la crescita del peptide su una resina insolubile per avere un processo nel quale i reagenti in eccesso vengono rimossi per semplici filtraggi e lavaggi, riducendo così, di gran lunga, la quantità di lavoro richiesto per la prima tecnica.

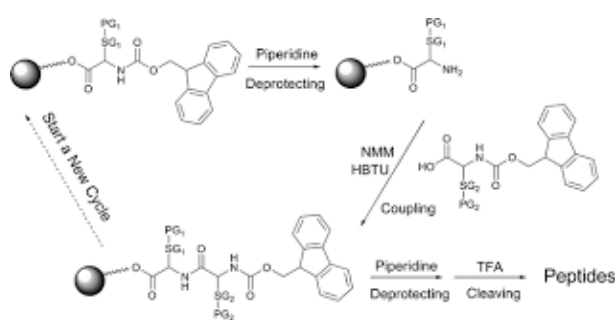


Figura 16 Schema formazione del legame peptidico a seguito di un ciclo di reazione (deprotezione e condensazione)

Tuttavia, pur essendo una tecnica molto più rapida, la SPPS presenta un fattore che ne limita l'efficienza di sintesi. La mancanza di purificazioni intermedie rende possibile, sul

supporto polimerico, la crescita di peptidi errati qualora la reazione di aggancio dell'amminoacido non vada a completezza. È chiaro quindi che, a termine della reazione di sintesi, si abbiano peptidi simili tra di loro, ma caratterizzati dall'assenza di uno o più amminoacidi e questo richiede complessi processi di purificazione per la loro rimozione. In questo progetto di tesi si è fatto uso di una SPPS con relativa crescita del peptide su una resina *Rink Amide MBHA* (sostituzione 0,52 mmoli/g), facendo uso di amminoacidi protetti con gruppo Fmoc.

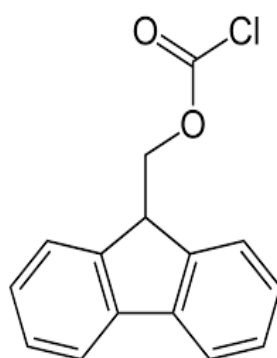


Figura 17 Gruppo protettore Fmoc

La scelta del gruppo protettore Fmoc determina inoltre la scelta dei gruppi protettori da utilizzare per le funzionalità laterali. La crescita del peptide avviene a seguito della deprotezione del gruppo protettore presente sulla funzionalità amminica e la reazione di *coupling*, ovvero la reazione di condensazione tra il gruppo amminico, dell'ultimo amminoacido del peptide in fase di crescita, con il gruppo carbossilico del residuo amminoacidico in fase di ancoraggio. Il ruolo giocato dai gruppi protettori laterali è quindi fondamentale nel veicolare la formazione del suddetto legame peptidico. A seguito dell'ancoraggio di tutti i residui amminoacidici si procede quindi con la rimozione dei gruppi laterali e con il distacco del peptide dalla resina. È chiaro, quindi, che i gruppi protettori laterali si devono differenziare da quelli Fmoc, onde evitare che la rimozione del gruppo protettore della funzione amminica porti alla rimozione anche dei gruppi protettori laterali. Nel caso specifico della SPPS trattata in questo progetto di tesi, si è fatto uso di quello che viene chiamato *accoppiamento ortogonale* tra gruppi protettori. Con tale termine si fa riferimento a gruppi che richiedono diversi meccanismi chimici per

la loro rimozione, come per esempio i gruppi Fmoc/tBu. Il primo risulta, difatti, essere un gruppo base labile e che quindi può essere rimosso con una soluzione basica come una soluzione di Piperidina 40% in DMF. Il secondo invece necessita di una soluzione acida per la sua rimozione, come una soluzione di TFA.

Spettroscopia di assorbimento

La spettroscopia di assorbimento è una tecnica basata sullo scambio di energia che si verifica tra una radiazione e la materia. Tale tecnica, in particolar modo, è interessata a fenomeni di assorbimento delle radiazioni luminose appartenenti al campo del visibile (350-700 nm) e dell'ultravioletto (200-350 nm).

L'utilizzo della spettroscopia di assorbimento Vis-UV consente di fare misure sia qualitative che quantitative. Per le prime, si fa uso di radiazioni policromatiche a spettro continuo, le quali vengono successivamente separate nelle loro componenti monocromatiche. Queste singole componenti, attraversando il campione, sono in grado di definire lo *spettro di assorbimento* della sostanza in esame, in quanto ogni singola radiazione monocromatica verrà assorbita con diversa intensità. Lo spettro di assorbimento è specifico per ogni sostanza ed è quindi possibile, esaminando tali spettri, identificare una sostanza o di controllare il livello di purezza. Per un'analisi quantitativa si fa uso, invece, di raggi monocromatici caratterizzati quindi da radiazioni con frequenza costante. L'analisi quantitativa deriva dalla proporzionalità diretta tra assorbimento e concentrazione del cromoforo. In particolar modo, andando a misurare l'assorbimento è possibile determinare la concentrazione del campione, secondo la legge di *Lambert-Beer*:

$$A = c \cdot \varepsilon \cdot d \quad (5)$$

Dove:

- A è l'assorbanza del campione;
- c è la concentrazione espressa in [mol/l];
- ε è il coefficiente di estinzione molare [$M^{-1}cm^{-1}$];
- d è il cammino ottico espresso in [cm];

La quantità di radiazione assorbita, ovvero l'assorbanza, viene calcolata a partire dalla misurazione dell'intensità del flusso luminoso e, in particolar modo, dalla misura della Trasmittanza T , intesa come rapporto tra l'intensità della radiazione misurata alla fine della cella contenente il campione (I) e l'intensità misurata all'inizio della cella col campione (I_0).

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (6)$$

La Trasmittanza quindi rappresenta la frazione di luce incidente che ha attraversato il campione senza essere assorbita. Nota la Trasmittanza è possibile, quindi, calcolare il valore dell'assorbanza con la seguente relazione:

$$A = \log\left(\frac{1}{T}\right) = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) \quad (7)$$

Purificazione e caratterizzazione del peptide

La purificazione e la caratterizzazione del peptide avvengono mediante analisi cromatografiche. La cromatografia è un processo chimico-fisico che permette di separare i costituenti di una miscela.

In questo lavoro di tesi viene trattata la cromatografia RP-HPLC, ovvero una cromatografia liquida ad alta prestazione a fase inversa.

Nel processo cromatografico si distinguono due fasi diverse nelle quali si distribuisce una sostanza: una fase stazionaria e una fase mobile.

In questo processo la fase stazionaria è costituita da particelle porose impaccate in una colonna all'interno della quale fluisce la parte mobile, detta anche eluente. Il termine *fase inversa* si riferisce alla funzionalizzazione delle particelle di fase stazionaria con lunghe catene alchiliche che la rendono idrofobica.

La capacità di migrazione di una sostanza tra la fase stazionaria e la fase mobile viene definita attraverso il *coefficiente di distribuzione* K_D , che all'equilibrio, viene definito come la percentuale di molecole nella fase stazionaria sul numero di molecole presenti nella fase mobile. Altri parametri fondamentali nelle analisi cromatografiche riguardano:

- Tempo di ritenzione: inteso come il tempo necessario ad una sostanza per essere eluita completamente;
- Efficienza della colonna: intesa come ampiezza dei picchi; Una colonna efficiente produce dei picchi molto stretti;
- Risoluzione: intesa come la capacità di separare due componenti, selettività ed efficienza di una separazione;

L'utilizzo di una cromatografia HPLC acquista una certa importanza nella separazione dei diversi componenti del soluto, in particolar modo per l'elevata velocità e risoluzione di tale tecnica. L'*alta prestazione* viene raggiunta facendo uso di una fase stazionaria costituita da particelle, compatte tra di loro, di diametro molto piccolo, dell'ordine delle decine di μm e dove la pressione, necessaria a spingere l'eluente attraverso la fase stazionaria, raggiunge valori molto elevati.

L'utilizzo di tecniche di analisi cromatografiche permette di svolgere:

- Un'analisi qualitativa andando a confrontare i tempi di ritenzione dei picchi ottenuti con quelli noti, permettendo così una identificazione di una determinata sostanza;
- Un'analisi quantitativa andando ad analizzare l'area sottesa al picco cromatografico, essendo questa proporzionale alla concentrazione della sostanza in esame;

- Una separazione preparativa andando ad isolare o purificare piccole quantità di materiale;

Le condizioni della corsa cromatografica e le caratteristiche della colonna influenzano i risultati ottenuti.

In questo lavoro di tesi si è fatto uso di una colonna Vydac 218TP (C18) per un'analisi qualitativa e di una colonna Novapac C18 per un'analisi semi-preparativa, analizzando il campione in modalità gradiente.

La cromatografia in gradiente permette di raggiungere una maggiore risoluzione dei picchi per i componenti di una miscela, a differenza di quanto è possibile osservare attraverso un'analisi in modalità isocratica, dove la concentrazione dell'eluente rimane costante nel tempo. Importanti per la fase stazionaria (la colonna) sono:

- Le dimensioni delle particelle impaccate: minori sono le dimensioni e maggiore è la risoluzione;
- La forma delle particelle (irregolari o sferiche): le particelle sferiche richiedono una minore pressione in quanto permettono una maggiore permeabilità della fase impaccata ed evitano il ristagno della fase mobile;
- La chimica della superficie: la presenza di gruppi funzionali sulla superficie determina la capacità della fase stazionaria di ritenere e separare determinate sostanze andando ad interagire, con interazioni secondarie, col soluto;

Un sistema di analisi cromatografico è costituito da diverse componenti assemblate tra loro. A costituire il sistema si trova quindi:

- Un sistema di pompaggio in grado di generare e gestire la portata dell'eluente all'interno del cromatografo;
- Una valvola di iniezione che permette l'ingresso del campione da analizzare;
- Una colonna ed eventualmente una pre-colonna;
- Un rivelatore in grado di produrre un segnale elettrico in funzione della concentrazione dell'analita;
- Un sistema di raccolta dati;

- Un sistema di degassaggio degli eluenti attraverso un flusso di gas inerte, con lo scopo di allontanare l'aria disciolta che si potrebbe trasformare in bolle all'interno del circuito cromatografico, provocando danni ingenti al funzionamento al sistema di pompaggio e di rilevazione;

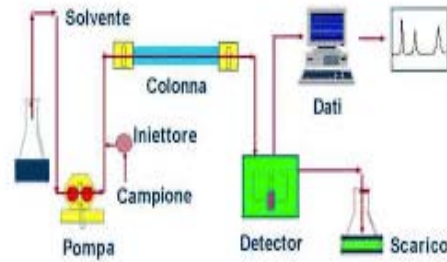


Figura 18 Schema di un sistema cromatografico HPLC

Analisi di massa

La spettrometria di massa rappresenta una tecnica in grado di fornire indicazioni sulla massa di molecole e di polipeptidi. Al fine di tali analisi sono possibili diverse configurazioni strumentali degli spettrometri di massa, che si differenziano per il sistema di ionizzazione, per il sistema di rivelazione e per l'analizzatore.

Uno spettrometro è costituito, quindi, da tre componenti fondamentali:

- la sorgente di ioni;
- l'analizzatore;
- il detector;

In questo lavoro di tesi, si è fatto uso della cosiddetta tecnologia *MALDI* (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*). Con tale tecnologia si ha l'evaporazione e la ionizzazione a seguito dell'eccitazione della molecola da parte di un laser. Il campione da analizzare viene sciolto in un eccesso di matrice e la soluzione viene depositata sugli appositi pozzetti presenti nel *target*. Una volta rimosso il solvente, la soluzione raggiunge lo stato

solido amorfo, il *target* viene inserito nella sorgente MALDI, la quale viene, a sua volta, posta sottovuoto. I diversi campioni, depositati sul *target*, vengono quindi investiti da un laser pulsato. Nel momento in cui un pozzetto viene investito dal laser, si ha l'assorbimento dell'energia da parte delle molecole della matrice. L'energia assorbita è sufficiente per portare all'evaporazione le molecole della matrice. Vengono trascinate in fase vapore anche le molecole del peptide, le quali, accelerate da un campo elettrico, entrano nell'analizzatore.

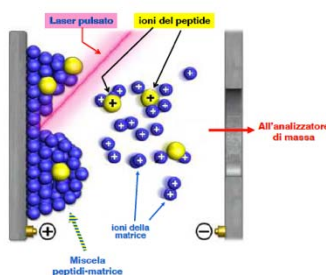


Figura 19 Schema dei processi presenti all'interno della sorgente MALDI

Per quanto concerne l'analizzatore, si è fatto uso di un analizzatore a *tempo di volo* (TOF). La spettrometria MALDI-TOF è ampiamente utilizzata in quanto risulta essere molto veloce ed affidabile, nonostante lo svantaggio dovuto alla necessità di utilizzare soluzioni quasi pure. L'analizzatore a tempo di volo mette in relazione il tempo impiegato da una particella per percorrere un determinato spazio in un mezzo definito con il rapporto tra la massa della particella e la sua carica. Tale relazione viene derivata considerando l'energia cinetica, posseduta da uno ione di carica z accelerato da una differenza di potenziale applicata V , secondo la relazione:

$$E_c = z \cdot V = \frac{m \cdot v^2}{2} \quad (8)$$

Dove v , indica la velocità con cui lo ione si muove dopo l'iniziale accelerazione, definita dalla relazione:

$$v = \frac{L}{t} \quad (9)$$

Dove appunto L è la lunghezza del volo e t il tempo impiegato a percorrere tale lunghezza. Come risultato di tale analisi viene riportato uno spettro che riporta l'intensità del segnale in funzione del rapporto massa su carica.

Parte sperimentale

Sintesi Peptidica

Sintesi peptide DAR-16

Presso il laboratorio di Bioingegneria del dipartimento di ingegneria industriale (Università degli studi di Padova) è stata svolta la sintesi del peptide DAR-16 mediante sintesi in fase solida.

La SPPS ha visto quindi l'ancoraggio su resina *Rink Amide MBHA* (sostituzione 0,52 mmol/g) di un totale di sedici residui amminoacidici di acido aspartico, di alanina e di arginina secondo la sequenza:



Di seguito verranno riportati gli *steps* che hanno condotto alla sintesi del peptide.

- *Rigonfiamento della resina e aggancio del primo amminoacido*

Si sono pesati 240 mg di resina pari a 0,125 mmoli. Il quantitativo di resina è stato quindi lasciato rigonfiare in 2 ml di DMF per circa 15 min.

Si è addizionato poi il primo residuo amminoacidico (in questo caso l'ultimo della catena, ovvero l'Arginina), sfruttando la funzionalità amminica della resina, la quale è in grado di reagire con il gruppo carbossilico dell'amminoacido. Dopo la rimozione del gruppo protettore, base labile, dalla resina facendo uso di una soluzione di piperidina al 40%, si è proceduto con l'attivazione del gruppo carbossilico del primo amminoacido e con la reazione di condensazione. Per quanto concerne la suddetta attivazione si è fatto uso di un agente attivante quale l'HBTU e di un catalizzatore per velocizzarne la reazione come l'*Oxyrna Pure*. Riguardo al quantitativo di materiale usato per la reazione di condensazione del primo amminoacido, si è pesato un quantitativo di reagenti pari a dieci

equivalenti, reagenti aggiunti in eccesso al fine di garantire una efficienza di reazione quanto più alta possibile.

- *Test sulla resa di funzionalizzazione della resina col primo amminoacido*

Al termine della reazione di condensazione del primo amminoacido, prima di procedere con la sintesi completa, si è fatta una valutazione sull'efficienza di reazione, attraverso una misura spettrofotometrica, seguendo il protocollo standard del cosiddetto *test alla piperidina*. Secondo protocollo, sono stati eseguiti tre diversi lavaggi della resina con metanolo, centrifugando e rimuovendo il surnatante ad ogni singolo ciclo di lavaggio, in modo da garantire la rimozione di tutti i reagenti in eccesso. Il reattore, contenente la resina lavata, è stato quindi posto a seccare sottovuoto, all'interno di una campana per un tempo di circa un'ora. A termine di questa fase è stato pesato un quantitativo di resina seccata all'intero di un *range* tra i 4 e gli 8 mg (quantitativo pesato = 7,3 mg). Il campione prelevato è stato, quindi, lasciato reagire con 0,5 ml di una soluzione al 20% (v/v) di piperidina in DMF, per un tempo totale di 15 min. Al termine della reazione si è posto il quantitativo in un matraccio da 50 ml e si è portato a misura con ulteriore DMF. Allo stesso tempo si è preparato il *bianco*. Per quest'ultimo, si sono poste le stesse soluzioni in un ulteriore matraccio da 50 ml, tralasciando la presenza del campione di resina. Si è quindi misurata l'assorbanza del campione, ad una lunghezza d'onda di 301 nm, tramite spettrofotometro UV-Vis (modello Lambda 2), azzerato con l'ausilio del bianco. In seguito, si è calcolata la resa come rapporto tra la sostituzione sperimentale e quella teorica:

$$resa (\%) = \frac{Sost. Sperimentale}{Sost. Teorica} \cdot 100 \quad (10)$$

La sostituzione sperimentale si è calcolata mediante la relazione:

$$Sost. Sperimentale = \frac{Abs_{301} \cdot Vol(ml)}{\varepsilon \cdot m(g)} \quad (11)$$

Dove:

- Abs_{301} rappresenta l'assorbanza misurata alla lunghezza d'onda di 301 nm, ovvero lunghezza alla quale si ha l'assorbimento della piperidina;
- $Vol(ml)$ rappresenta il volume della soluzione contenente il campione;
- ε ($M^{-1}cm^{-1}$) rappresenta il coefficiente di estinzione molare il cui valore numerico è funzione del solvente utilizzato e dalla lunghezza d'onda utilizzata;
- $m(g)$ rappresenta il peso, in grammi, del campione di resina prelevato per il test;

Per il calcolo della *sostituzione teorica* si è tenuto in considerazione anche il peso molecolare del peptide in crescita secondo la relazione:

$$Sost. Teorica = \frac{1000}{PM_{resina} + PM_{peptide}} \quad (12)$$

Dove:

- PM_{resina} rappresenta il valore, in g/moli, del peso molecolare della resina;
- $PM_{peptide}$ rappresenta il peso molecolare, in g/moli, dei residui amminoacidici legati alla resina;
- *Reazioni di Deprotezione e Coupling*

Al raggiungimento di un'alta resa di funzionalizzazione della resina sufficiente (deve essere, quanto più possibile, prossima ad una resa del 100%) si è proceduto con le reazioni

di *coupling* dei restanti amminoacidi. In primo luogo, si è pesato e solubilizzato il quantitativo di ogni singolo amminoacido relativo a cinque equivalenti in delle provette Falcon e si è solubilizzato il tutto in DMF secondo le corrette quantità riportate di seguito:

- Fmoc-Ala-OH (PM=311,30 g/mole): 3,002 g in 13,13 ml di DMF;
- Fmoc-Asp(Obut)-OH (PM=411,50): 2,049 g in 6,29 ml di DMF;
- Fmoc-Arg(Pbf)-OH (PM=648,78): 2,367 g in 4 ml di DMF;

Allo stesso tempo si sono preparate le soluzioni necessarie per le reazioni di deprotezione:

- Soluzione al 40% di piperidina in DMF;

e di condensazione:

- Soluzione di HBTU/*Oxyma pure* in DMF con concentrazione di 0,45 mol/l;
- Soluzione di DIPEA in NMP con concentrazione di 2,03 mol/l;

Si è impostata la sintesi sul sintetizzatore automatico (modello Syro I) e si è proceduto con la reazione di condensazione del secondo residuo amminoacidico (Alanina) e del terzo (Arginina), mediante *coupling singolo*. Al termine dell'ancoraggio del terzo residuo, si è proceduto con un primo test alla ninidrina per misurare, tramite misura spettrofotometrica, il quantitativo di ammine libere e di conseguenza la resa di reazione. Si è proceduto quindi poi con *coupling singoli* fino al quinto amminoacido in catena (Acido Aspartico) per poi ripetere un secondo test alla ninidrina. Si è proceduto con la sintesi, mediante *coupling doppi*, fino alla condensazione del dodicesimo amminoacido (Alanina) dopo di che si è effettuata una acetilazione dei gruppi amminici non reagiti mediante una soluzione al 10% (v/v) di anidride acetica e al 5% di DIPEA (v/v) in DMF. Dopo acetilazione si è portata a termine la sintesi con reazioni di doppio *coupling* fino all'ancoraggio dell'ultimo residuo, per poi procedere con l'operazione di sblocco del peptide dalla resina

- *Resa di coupling mediante Kaiser Test*

La resa di reazione di *coupling* si è calcolata mediante un *Kaiser Test*, noto anche come test alla ninidrina. Con tale test si è proceduto con la valutazione del quantitativo di gruppi amminici liberi attraverso analisi spettrofotometrica. La reazione attraverso la quale si produce il gruppo cromoforo viene riportata di seguito.

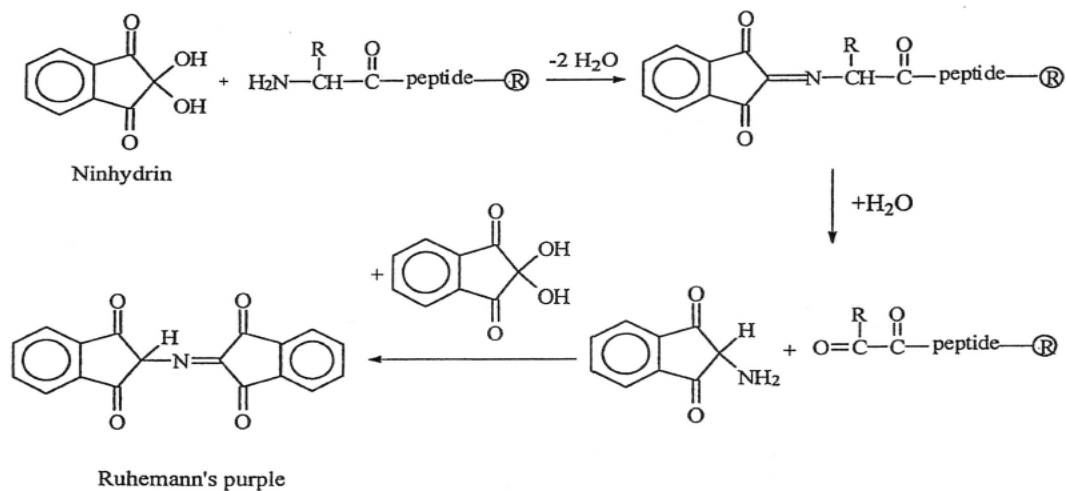


Figura 20 Reazione della ninidrina col residuo N-terminale del peptide in crescita

Per quanto concerne la fase sperimentale, si è proceduto con il test alla ninidrina al termine della reazione di condensazione del terzo e del quinto residuo amminoacidico. Si è proceduto, in primo luogo, con il lavaggio del reattore con metanolo e con DCM e si è posto a seccare sottovuoto per un tempo di 1 h. Nel frattempo si è acceso lo spettrofotometro UV a 570 nm.

Al termine previsto per seccare il campione presente nel reattore, se ne è prelevato un quantitativo compreso tra i 2 e gli 8 mg e lo si è posto in una provetta. Sotto cappa sono stati aggiunti quindi nel seguente ordine:

- 75 μl di Monitor 1 (76%w/v fenolo/etanolo);
- 100 μl di Monitor 2 (cianuro di potassio/piridina);
- 75 μl di Monitor 3 (ninidrina/etanolo);

In modo del tutto analogo si è preparata una seconda provetta contenente solo i tre Monitor, come riferimento (bianco). Si sono poste quindi le due provette all'interno di una piastra riscaldante, precedentemente portata a 100°C, per un tempo di 5 minuti per la chimica Fmoc.

Allo scadere di questo tempo si sono prelevate le due provette e si aggiunto, in ciascuna di essa, un quantitativo pari a 4,8 ml di Monitor 4 (60% etanolo in H₂O).

Si è, quindi, azzerato lo spettrofotometro con il solo Monitor 4 e si è proceduto con la misura dell'assorbanza rispettivamente del riferimento e del campione.

La resa si è valutata a partire dal calcolo delle μMoli su grammo di ammine libere secondo:

$$\frac{\mu\text{mol}}{\text{g}} \text{ ammine libere} = \frac{[(Abs_{camp.} - Abs_{bianco}) \cdot diluizione (ml) \cdot 10^6]}{\varepsilon \cdot \text{peso del campione (mg)}} \quad (13)$$

Dove

- *Abs* rappresenta l'assorbanza misurata per il campione e per il bianco;
- Il *volume* è pari a 5 ml;
- ε rappresenta il coefficiente di estinzione molare pari a 15000 M⁻¹cm⁻¹;

Quindi la percentuale di *coupling* la si è ottenuta mediante la relazione:

$$\% \text{ Coupling} = \left(1 - \frac{\frac{\mu\text{mol}}{\text{g}} \text{ di ammine}}{10^3 \cdot \text{nuova sostituzione}} \right) \quad (14)$$

Dove la *nuova sostituzione* è misurata tramite la (12).

- *Sblocco peptide dalla resina*

A fine sintesi si è sbloccato il peptide dalla resina. In primo luogo, si sono effettuati dei lavaggi del reattore con DCM e lo si è posto a seccare sottovuoto per 30 minuti, prima dello sblocco. Si è proceduto con la preparazione di 5 ml di una soluzione acida con lo scopo di rimuovere, allo stesso tempo, tutti i gruppi protettori delle catene laterali e il peptide dalla resina. In particolare modo si è proceduto con la preparazione di una soluzione così costituita:

- 4,75 ml di TFA (95% v/v);
- 125 µl di H₂O (2,5% v/v);
- 125 µl di TES (2,5 v/v);

Si è lasciato reagire per un tempo di un'ora e mezza, agitando il reattore, manualmente, di tanto in tanto per assicurarsi una reazione di sblocco su tutto il campione (resina-peptide).

Al termine della reazione, attraverso filtrazione, si è recuperata la soluzione contenente il peptide, successivamente portata a piccolo volume mediante l'uso di un evaporatore rotante. A questo punto, si è aggiunto dell'etere dietilico freddo (a circa 4°C) per permettere la precipitazione del peptide. Rimosso l'etere si è proceduto con la solubilizzazione del campione in acqua e lo si è posto a liofilizzare.

Purificazione del peptide DAR-16

Per la valutazione della qualità del peptide grezzo sintetizzato, si è condotta un'analisi cromatografica analitica preliminare sul campione liofilizzato. Si è prelevato un quantitativo di 1 mg di DAR-16 e lo si è solubilizzato, in rapporto 1:1, con 1 ml di acqua Milli-Q e si è filtrata la soluzione in una *Eppendorf*. Si è proceduto quindi analizzando il campione nelle seguenti condizioni:

- Colonna Vydac C18;
- Eluente A: 0,05% TFA in H₂O Milli-Q;

- Eluente B= 0,05% TFA in acetonitrile;
- Volume iniettato: 120 μ l;
- Gradiente: dal 5% al 20% di B in 30 min;
- Flusso: 1 ml/min;

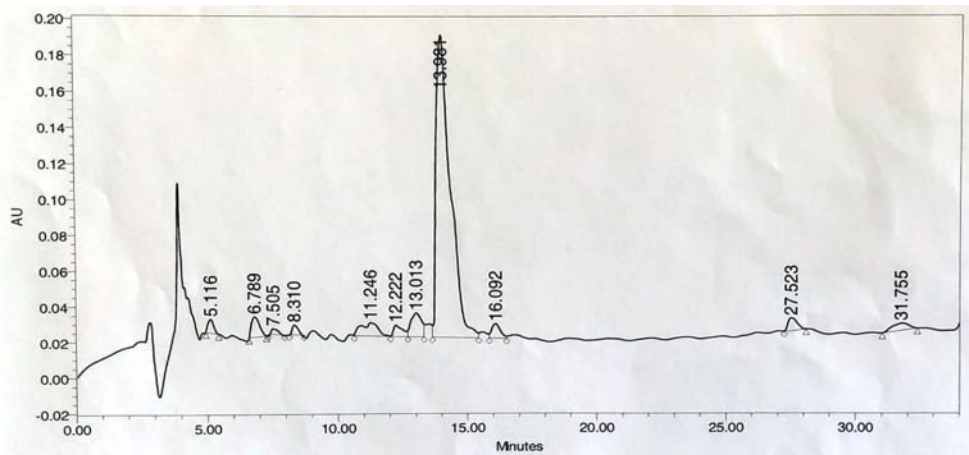


Figura 21 Cromatografia del peptide DAR-16 grezzo. Colonna Vydac C18; gradiente dal 5% al 20% in B in 30 min

Si è proceduto poi con una analisi cromatografica semipreparativa con lo scopo di rimuovere le impurità evidenziate dall'analisi analitica e con la conseguente purificazione del peptide. Si è proceduto solubilizzando 20 mg del peptide grezzo in 60 ml di H₂O Milli-Q con l'aggiunta del 2,5% (w/v) di KCl e filtrando la soluzione così ottenuta. L'analisi semipreparativa è stata quindi condotta nelle seguenti condizioni:

- Colonna NovaPak C18;
- Eluente A: 0,05% TFA in H₂O Milli-Q;
- Eluente B= 0,05% TFA in acetonitrile;
- Gradiente da 0% a 20% di B in 40 min;
- Flusso: 4 ml/min;

Durante l'analisi si è frazionato l'eluato in diverse provette e si è svolto un'ulteriore analisi analitica delle frazioni più significative, con le medesime condizioni su riportate, in modo da valutare il grado di omogeneità del peptide nelle diverse frazioni.

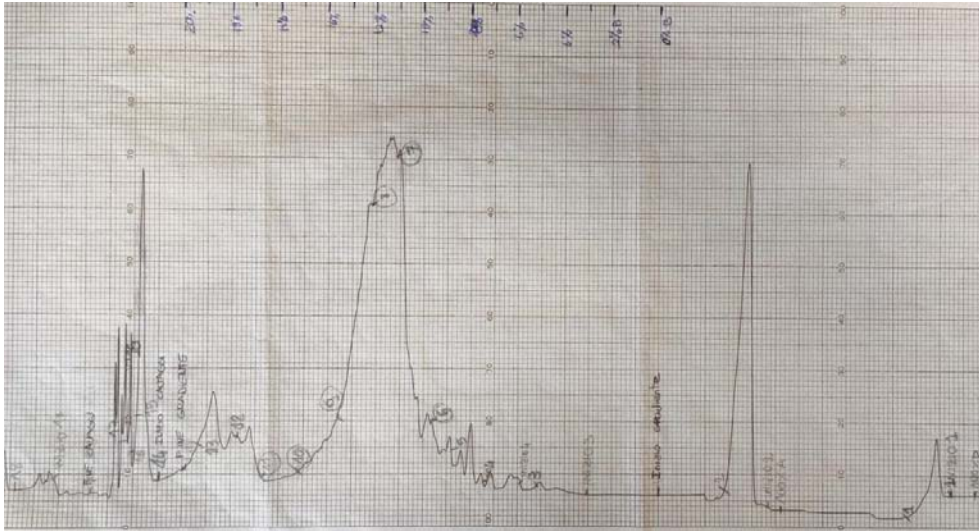


Figura 22 Analisi cromatografica semipreparativa (SP1) del peptide grezzo. Colonna NovaPack; gradiente da 0% a 20% in 40 min

Architetture tridimensionali a base di idrogeli e cellule

Presso il *Cell Biology & Tissue Engineering Laboratory* del King's College di Londra è stata svolta la parte dell'elaborato relativa alla preparazione di architetture tridimensionali di idrogeli e cellule tramite stampa 3D.

Al fine di una maggiore comprensione, i successivi paragrafi sono suddivisi in base ai passaggi fondamentali del processo.

Si distinguono quindi i seguenti *steps*:

- Coltura cellulare di NHAC (*Normal Human Articular Chondrocytes*);
- Preparazione delle soluzioni di Alginato e verifica della possibilità di stampa;
- Preparazione dell'idrogel;
- Test di vitalità delle cellule;
- Test di attività cellulare;

Coltura cellulare

Per quanto concerne la semina di cellule, si è fatto uso di una linea cellulare di NHAC in un terreno di coltura arricchito con il 20% di FCS.

Per il mantenimento delle cellule si è aggiunto quindi al DMEM (+o- phenol red, Sigma 6429) una aliquota pari a 10 ml di HEPES 1M, una di L-glutammina pari a 5 ml, una di Pen/Strep 100x pari a 10 ml, due aliquote di FCS per un totale di 100 ml e infine una quantità di acido ascorbico pari ad un peso di 0,075 g secondo protocollo.

Una volta ricevute le cellule (NHAC P21) si è proceduto con il primo processo di rivitalizzazione e con la semina in una fiasca per coltura cellulare (25 cm²).

- *Processo di rivitalizzazione*

Le cellule sono state fornite all'interno di una *vials*, poste in quella che è comunemente chiamata *freeze mixture*, ovvero terreno per coltura cellulare addizionato con DMSO, agente di crioprotezione nello stoccaggio a lungo termine di cellule. Da qui, si è prelevata la soluzione contenente le cellule e la si è trasferita all'interno di una provetta conica per centrifuga. Si è eseguito poi un lavaggio con DMEM in modo da assicurare il prelievo totale di tutte le cellule e si sono addizionati altri 10 ml di media all'interno della provetta. Si è centrifugato il tutto ad una velocità di 2000 rpm per un tempo di 5 minuti. Il surnatante è stato quindi rimosso e si è disperso nuovamente il pellet di cellule ottenuto in 5 ml di media per coltura cellulare. La soluzione è stata poi posta in una fiasca da 25 cm², permettendo così l'ancoraggio delle cellule e la loro riproduzione sulla superficie funzionalizzata della fiasca.

Una volta giunte a convergenza (riempimento della fiasca oltre il 75%), si è proceduto con il primo *split*.



Figura 23 Fiasca per coltura cellulare

- *Splitting delle cellule*

Si è rimosso il medium presente nella fiasca, si è proceduto con un lavaggio con PBS (5 ml) e con l'aggiunta di 1 ml di Tripsina 100x per 5 min in incubatrice. Questo passaggio specifico è richiesto per separare le cellule adese alla fiasca in quanto la tripsina è un enzima che catalizza il cosiddetto "taglio proteolitico", ovvero la degradazione delle proteine di adesione. Il mantenimento delle cellule nella Tripsina per un tempo maggiore comporterebbe il danneggiamento della membrana cellulare, con conseguente morte delle cellule.

Dopo i 5 min in incubatrice si è verificato che le cellule, in precedenza adese, si fossero staccate completamente (Fig. 24b) e si è poi proceduto con l'aggiunta di nuovo medium per bloccare la reazione della Tripsina. Si è prelevato poi il nuovo medium contenente le cellule sospese e si è centrifugato per altri 5 min con una velocità di 2000 rpm. Si è infine rimosso il surnatante e si è disperso nuovamente il pellet di cellule in altri 10 ml di nuovo medium. Infine, si è suddivisa questa nuova soluzione in due nuove fiasche, aggiungendo 6 ml di medium in ciascuna.

Si è ripetuto questo processo ogni qualvolta le cellule sono arrivate a confluenza.

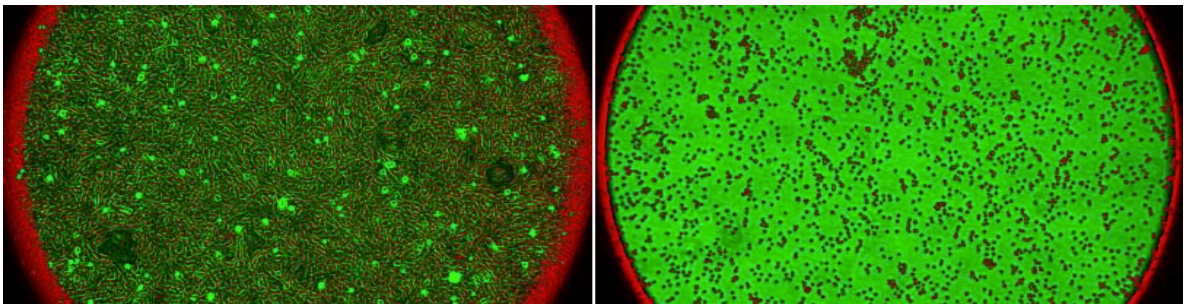


Figura 24 a) immagine al microscopio di cellule NHAC aderite alla fiasca e in convergenza b) Cellule NHAC separate dalla fiasca per mezzo dell'azione della Tripsina

Preparazione della soluzione di Alginato e *setting-up* del bioplotter

Si è effettuato il *setting-up* dei parametri della *Bio printer Rokit INVIVO* utilizzando una soluzione di Alginato, variando la concentrazione in un *range* tra il 2,5% e il 3,5% (w/v)

per l'Alginato ad alta viscosità (1000-1500 mPas per 1% di soluzione) e tra il 10% e il 20% (w/v) per Alginato a bassa viscosità (4-12 mPas per 1% di soluzione).

Si è preparata inizialmente una soluzione di Alginato ad alta viscosità con una concentrazione pari a 3,5% (w/v) in PBS e con questa soluzione si sono svolti diversi test con lo scopo di verificare l'effettiva *printabilità* della soluzione, variando principalmente il flusso uscente dall'ago in un *range* tra i 200 e i 600% (parametro macchina).

Di seguito si riporta un riepilogo delle prove eseguite.

Alginato 3,5% ad alta viscosità in PBS	
	Flusso input %
Prova 1	200
Prova 2	600
Prova 3	300
Prova 4	400
Prova 6	270
Prova 7	350

Tabella 1 Setting-up del flusso uscente dall'estrusore

Definito il flusso ottimale (350%) si è proceduto con l'impostare altri parametri di processo come la velocità di stampa, il numero di *layer*, l'altezza tra un *layer* e l'altro e l'eventuale ritrazione.

Si è proceduto, poi, con il testare diverse soluzioni di Alginato al fine di individuare la viscosità ottimale per poter stampare uno *scaffold* privo di difetti. Questa viscosità è stata misurata attraverso prove reologiche dei campioni preparati. In particolar modo, si sono prodotte le nuove soluzioni sostituendo il PBS con il terreno di coltura completo per simulare quanto più possibile le condizioni della soluzione finale.

La necessità di avere una struttura stabile, dopo stampa, ha condotto inoltre alla ricerca di una soluzione ottimale per la reticolazione della struttura del gel di alginato. In particolar modo si sono sfruttati gli ioni Ca^{2+} di una soluzione di CaCl_2 , ioni responsabili della reticolazione delle catene di alginato, per determinare la concentrazione in grado di garantire l'ottenimento di un supporto tridimensionale con proprietà meccaniche tali da sostenere il peso dei diversi *layer*. Sono state quindi prodotte le seguenti soluzioni:

- Soluzioni di Alginato:
 - Alginato 2,5% (w/v) in DMEM completo (alta viscosità);
 - Alginato 3% (w/v) in DMEM completo (alta viscosità);
 - Alginato 3,5% (w/v) in DMEM completo (alta viscosità);
 - Alginato 10% (w/v) in DMEM completo (bassa viscosità);
 - Alginato 15% (w/v) in DMEM completo (bassa viscosità);
 - Alginato 20% (w/v) in DMEM completo (bassa viscosità);

- Soluzione di CaCl₂:
 - o CaCl₂ 1%(w/v) in H₂O Milli-Q;
 - o CaCl₂ 1,5%(w/v) in H₂O Milli-Q;
 - o CaCl₂ 2%(w/v) in H₂O Milli-Q;
 - o CaCl₂ 2,5%(w/v) in H₂O Milli-Q;

Si sono testate le diverse soluzioni estrudendo manualmente ognuna di esse in una piastra a 24 pozzetti e sommergendole poi con la soluzione *cross-linkante*, valutandone le caratteristiche dopo 1min, 5min, 10min, 15min, 30min.

Con le soluzioni più soddisfacenti (vedesi capitolo discussioni e risultati) si è proceduto, poi, con la vera e propria stampa 3D del supporto e con la reticolazione nelle tempistiche sopra riportate. Si è eseguito questo test per valutare la successiva degradazione del supporto una volta immerso nel DMEM contenente i nutrienti per le cellule.

Soluzione	Durata <i>cross-linking</i>
3,5% (w/v) in DMEM completo	15,30 min
15% (w/v) in DMEM completo	1,5,10,15,30 min
20% (w/v) in DMEM completo	1,5,10,15,30 min

Tabella 2 Riepilogo delle tempistiche di cross-linking

Come si evince da *Tabella 2* le tempistiche variano a seconda del peso molecolare del materiale usato. L'alginato ad alto peso molecolare ha evidenziato tempi di reazione più elevati e quindi richiesto maggiori tempi di esposizione alla soluzione di CaCl_2 per acquisire proprietà meccaniche sufficienti ad essere trasferito in una piastra a 24 pozzetti.



Figura 25 Scaffold di Alginato al 20% (w/v) a bassa viscosità cross-linkato rispettivamente con tempi di 1 min, 5 min, 10 min.

Preparazione Idrogel

Si è voluto, in seguito, valutare, nella fase di preparazione dell'idrogel, l'affinità delle cellule con il gel stesso. Si è proceduto, in primo luogo, a sterilizzare tutti i materiali mediante sterilizzazione in autoclave (spatole e becher) e UV (*powder* di alginato). Si è posta la fiasca contenente le cellule sotto cappa e si è proceduto con la separazione, il prelievo e il conteggio delle cellule. In particolar modo, una volta ottenuto il pellet (processo del tutto analogo a quanto visto nel paragrafo *coltura cellulare*) si è proceduto disperdendo le cellule in 1 ml di DMEM completo e sono stati prelevati e posti in una *vials* 50 μl della soluzione.

Si è posto poi all'interno della *vials*, in egual misura, un quantitativo di *Trypan Blue*, si è prelevato un quantitativo di 10 μl e si è proceduto con il conteggio automatico.

Definito il numero di cellule da utilizzare (1×10^6 cellule/ml) si è centrifugata nuovamente la soluzione per riottenere il pellet, successivamente disperso nel quantitativo di medium richiesto per la soluzione. Si è poi introdotto nel DMEM l'alginato e si è mescolato molto delicatamente con una spatola evitando di stressare notevolmente le cellule e la formazione di bolle.

A gel formatosi si è posto in una piastra a 24 pozzetti un quantitativo di gel sufficiente a coprire il fondo del pozzetto in triplicato e si è *cross-linkato* con una soluzione al 2,5% (w/v) di CaCl₂ per un tempo di 30 minuti, evitando così la diluizione del gel una volta aggiunto ulteriore DMEM per fornire alle cellule il corretto nutrimento.

Per quanto concerne la vera e propria prova di stampa, l'idrogel prodotto tramite agitazione manuale è stato posto all'interno di una siringa da 5 ml e poi centrifugato a 1800 rpm per una durata di 2 minuti, in modo da garantire la rimozione delle bolle d'aria formatesi, deleterie sia per la sopravvivenza delle cellule sia per il processo di stampa, in quanto responsabili di una estrusione non continua. Si è trasferita poi la siringa contenente la soluzione all'interno del *Bio printer Rokit INVIVO*, strumento utilizzato come primo banco di prova sperimentale. Si è svolto dunque un test di controllo sulle cellule per valutarne la loro sopravvivenza a fine processo.

Uno studio del tutto analogo è stato svolto aggiungendo, prima dell'introduzione del *powder* di alginato, un quantitativo di 10 µl di soluzione acquosa contenente il peptide DAR-16 con concentrazione pari a 250 mM. Tale studio ha voluto evidenziare i possibili effetti di un peptide auto-assemblante nel processo.

In entrambi i casi, la preparazione dell'idrogel, pur essendo sulla carta un passaggio semplice, si è rivelata uno degli aspetti più critici dell'intero processo, a causa della necessità di operare in un ambiente controllato e sterile.



Figura 26 Bio printer Rokit INVIVO

Live/Dead test

La vitalità delle cellule è stata valutata tramite l'utilizzo di due protocolli diversi al fine di identificare il metodo migliore: *Cellbrite* e *Live/Dead assay*.

Per il *Live/Dead assay* si è eseguito, in primo luogo, un test per identificare le concentrazioni ideali dei reagenti da utilizzare nel test. In particolar modo si è voluta ottimizzare la concentrazione dell'omodimero di Etidio, variandone la concentrazione tra un *range* di 0,1 μ M a 5 μ M, mantenendo fissa quella di Calceina AM ad una concentrazione di 1 μ M.

Analizzati i risultati e fissate le concentrazioni (si veda il capitolo successivo), si è proceduto con i test di vitalità sui campioni precedentemente preparati come descritto nei paragrafi sopra riportati, ovvero su campioni costituiti dal solo gel arricchito con cellule e dal gel stampato. Si considera come controllo, le sole cellule adese in uno dei pozzetti. Si è dunque prelevata, dall'incubatrice, la piastra a 24 pozzetti contenente i campioni preparati 24 ore prima. Si è dunque rimosso il terreno di coltura presente e si è aggiunto 1ml di nuovo DMEM contenente la soluzione Etidio/Calceina AM per il *Live/Dead assay* e il *Cellbrite green cytoplasmic membrane dye* per il secondo protocollo. A seguire si è posta nuovamente la piastra in incubatrice per un tempo di 1 ora e mezza. Al termine del tempo fissato, si sono eseguite le analisi tramite microscopio a fluorescenza.

Analizzando i risultati si è proceduto, nei successivi esperimenti con il saggio *Live/Dead*.

Alamar Blue assay

Si è fatto uso del test Alamar Blue per valutare la proliferazione delle cellule all'interno dei campioni in presenza e in assenza del peptide DAR-16, stampati e non stampati.

Innanzitutto, si è preparata la soluzione di Alamar Blue diluita a 10x con DMEM *phenol free*.

Si sono quindi preparate due piastre, da 24 pozzetti, per una valutazione a 24h e 48h contenenti i diversi campioni così preparati:

- 3 campioni di idrogel a base di alginato 3,5% (alta viscosità) in DMEM;
- 3 campioni di idrogel a base di alginato 3,5% (alta viscosità) in DMEM stampati manualmente;
- 3 campioni di idrogel a base di alginato 3,5% (alta viscosità) in DMEM + 0,2% DAR-16 (250 mM);
- 3 campioni di idrogel a base di alginato 3,5% (alta viscosità) in DMEM + 0,2% DAR-16 (250 mM) stampati manualmente;
- 1 controllo di sole cellule NHAC;

Per l'analisi si è rimosso quindi il DMEM presente nei pozzetti e si è aggiunto 1 ml di soluzione diluita di Alamar Blue. I campioni sono stati quindi posti in incubatrice per 4h. Al termine del tempo fissato si è posto, all'interno di una piastra da 96 pozzetti, 100 µl di soluzione. All'interno della piastra, oltre alla soluzione prelevata dai campioni e dal controllo, si è aggiunto un quantitativo della soluzione di Alamar Blue precedentemente preparata. Si è misurata, poi, l'assorbanza dei campioni ad una lunghezza d'onda di 570 nm e con una lunghezza d'onda di riferimento di 630 nm.

Risultati e discussioni

Si riportano, in questo capitolo, i diversi risultati ottenuti durante la fase sperimentale a partire dalla produzione degli *scaffolds*, fino all'introduzione del peptide con valutazione degli effetti sulle cellule.

Sintesi e purificazione peptide auto-assemblante DAR-16

Al fine dello studio degli effetti prodotti dall'introduzione di un peptide, all'interno di uno *scaffold*, si proceduto con la sintesi del peptide auto-assemblante DAR-16, tramite SPPS.

Il test alla piperidina ha fornito la resa di funzionalizzazione della resina con il primo amminoacido condensato (Arginina). Tenendo in considerazione il peso dell'amminoacido protetto dal gruppo protettore Fmoc sulla funzionalità amminica e facendo riferimento alle formule (10,11,12), riportate nella parte sperimentale, la resa di funzionalizzazione ottenuta è pari:

$$resa (\%) = \frac{Sost.Sperimentale}{Sost.Teorica} \cdot 100 = \frac{0,43}{0389} \cdot 100 = 110\% \quad (10)$$

Dove:

$$Sost.Sperimentale = \frac{Abs_{301} \cdot Vol(ml)}{\varepsilon \cdot m(g)} = \frac{(0,484 \cdot 50)}{7800 \cdot 7,3 \cdot 10^{-3}} = 0,43 \quad (11)$$

$$Sost. Teorica = \frac{1000}{PM_{resina} + PM_{peptide}} = \frac{1000}{1923,07 + 645.804} = 0,389 \quad (12)$$

La resa delle reazioni di condensazione degli amminoacidi in crescita si è misurata, invece, attraverso il test alla ninidrina e al conseguente calcolo delle ammine libere mediante le relazioni (13) e (14).

Il test condotto, dopo la condensazione del terzo amminoacido, ha evidenziato una resa pari a:

$$\%coupling = \left[1 - \frac{\frac{\mu mol}{g} \text{ di ammine libere}}{10^3 \cdot nuova\ sost \left(\frac{mmol}{g} \right)} \right] \cdot 100 = 99,3\% \quad (14)$$

Dove

$$\frac{\mu mol}{g} \text{ ammine} = \frac{Abs_{camp} - Abs_{bianco}}{3 \cdot peso (mg)} = \frac{0,138 - 0,091}{3 \cdot 6,6} = 2,37 \quad (13)$$

In modo del tutto analogo, si è misurata la resa della reazione dopo la condensazione del quinto amminoacido (Acido Aspartico), ottenendo una resa pari a:

$$\%coupling = \left[1 - \frac{\frac{\mu mol}{g} \text{ di ammine libere}}{10^3 \cdot nuova\ sost \left(\frac{mmol}{g} \right)} \right] \cdot 100 = 98,72\% \quad (14)$$

Dove le ammine libere equivalgono a:

$$\frac{\mu\text{moli}}{\text{g}} \text{ ammine} = \frac{Abs_{camp} - Abs_{bianco}}{3 \cdot \text{peso (mg)}} = \frac{0,143 - 0,071}{3 \cdot 6,2} = 3,871 \quad (13)$$

Al termine della reazione di sintesi e dello sblocco del peptide dalla resina, si è ottenuto un quantitativo di peptide grezzo pari a 144 mg, la cui qualità è stata valutata mediante corse cromatografiche analitiche. Iniettando un campione di 120 μl (rapporto 1mg:1ml di H₂O Milli-Q) con un gradiente dal 5% al 20% in 30 minuti dell'eluente B, che si ricorda essere 0,05% TFA in acetonitrile, si è ottenuto lo spettro di assorbimento già evidenziato in figura (21).

Da tale analisi si ricava il tempo di ritenzione del peptide, ovvero il tempo necessario per la sostanza iniettata per percorrere tutta la colonna. Il tempo così definito risulta essere pari a 13,9 minuti. Dall'analisi cromatografica si può ricavare inoltre che il peptide grezzo non presenta molti prodotti secondari.

Le analisi cromatografiche semi-preparative hanno, invece, permesso il frazionamento dell'eluato e la purificazione del peptide. Le varie frazioni ottenute sono state analizzate, tramite cromatografie analitiche. In particolar modo, nel caso della prima semi-preparativa (SP1), si sono analizzate le frazioni 7,8,9, sottolineate in figura (22). La frazione 8, in particolar modo, ha evidenziato una purezza del peptide pari al 97,46%, valore misurato attraverso integrazione del tracciato cromatografico.

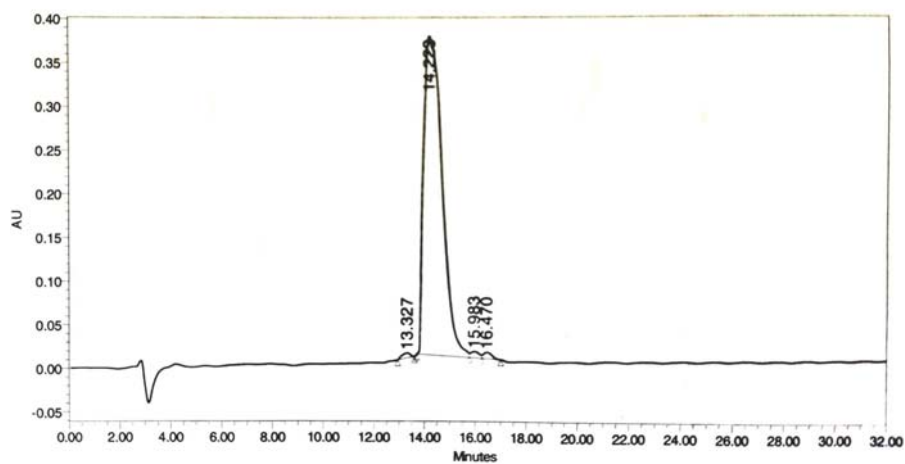


Figura 27 Cromatografia analitica della frazione 8 del peptide DAR-16 purificato tramite SPI.
Colonna Vydac C18; gradiente dal 5% al 20% in B in 30 min

Le frazioni 7 e 8 sono state rispettivamente raccolte in due ulteriori *pool* in quanto corrispondenti a delle impurità in *testa* e in *coda* al peptide.

In modo del tutto analogo si è purificato tutto il quantitativo di peptide grezzo, raccogliendo in *pool* le frazioni simili tra loro e procedendo con ulteriori purificazioni in presenza di impurezze.

Si riporta di seguito l'analisi di massa del peptide grezzo.

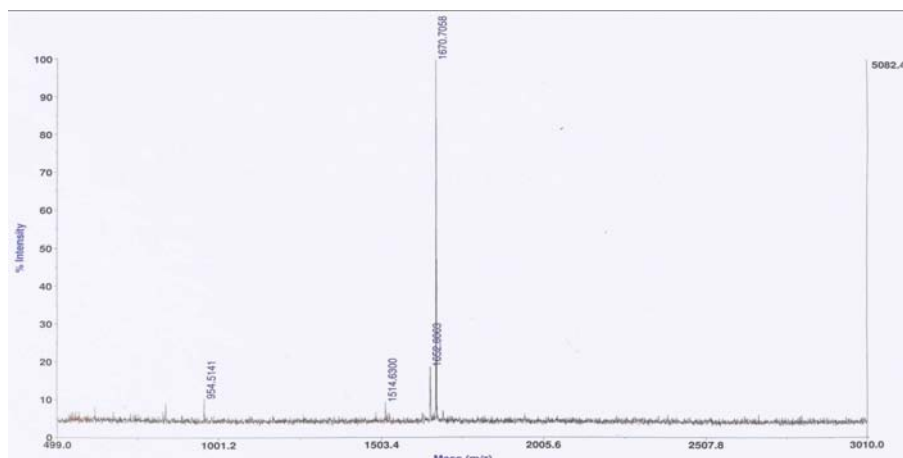


Figura 28 Spettrometria di massa (MALDI-TOF) su peptide DAR-16

Preparazione degli *scaffolds*

Al fine della produzione di un vero proprio *bioink* utilizzabile per la produzione di un supporto 3D per la TE, sono stati svolti diversi test su delle soluzioni di Alginato, sia ad bassa sia ad alta peso viscosità. Le soluzioni in particolar modo sono state testate tramite stampa con il *Bio printer Rokit INVIVO*.

Dai test svolti sulle diverse soluzioni, i risultati più promettenti si sono ottenuti mediante l'uso delle soluzioni di alginato di sodio 20% (w/v) a bassa viscosità e con l'alginato al 3,5% (w/v) ad alta viscosità, facendo uso di una reticolazione mediante una soluzione *cross-linkante* di 2,5% CaCl₂.

Gli *scaffold*, prodotti, inizialmente senza la presenza di cellule, sono stati ottenuti con le seguenti condizioni di stampa:

- Temperatura: 25°C;
- Densità di riempimento del supporto: 20%;
- Velocità di stampa: 3 mm/s;
- Velocità spostamento: 10 mm/s;
- Velocità di ritrazione: 1 mm/s;
- Altezza layer: 0.2 mm;
- Diametro ugello estrusore: Ago G21;
- Distanza retrazione: 0.5 mm;
- Flusso di input: 250%;

Le scarse proprietà meccaniche del solo gel di Alginato e il collasso della struttura prodottasi sotto il peso dei *layer* successivi, hanno suggerito di operare una parziale reticolazione nel mezzo della stampa con una soluzione di CaCl₂ al 1% (w/v) per 5 minuti. La reticolazione completa si è svolta, poi, al termine del processo, immergendo lo *scaffold* nella soluzione reticolante (2,5% CaCl₂) per 30 min.

Le prove reologiche effettuate, su quattro campioni di soluzione, evidenziano il comportamento pseudoplastico del materiale (figura 29).

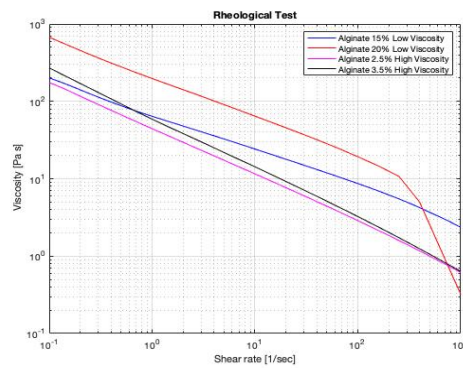


Figura 29 Risultati delle prove reologiche delle soluzioni di Alginato al 15%-20% a bassa viscosità e 2,5%-3,5% ad alta viscosità

Come si evince dal grafico, appunto, il comportamento pseudoplastico è ben visibile ed è rappresentato dalla diminuzione della viscosità con l'aumentare della velocità di deformazione. È interessante osservare come, al variare del peso molecolare del materiale utilizzato, cambi la pendenza di tali curve definendo uno *shear thinning* più rapido.

L'aspetto reologico della soluzione è di rilevante importanza per la produzione di un *Bioink* contenente le cellule. A parità di velocità di deformazione è chiaro che un materiale meno viscoso subisce uno *shear stress* inferiore rispetto ad un materiale più viscoso, *shear stress* che viene trasmesso anche alle cellule presenti e che può danneggiarne la struttura portandole alla morte. La conoscenza dell'aspetto reologico consente di ottimizzare il *range* di viscosità al fine di trovare il valore minimo per garantire l'estrusione della soluzione. Si è proceduto con lo studio della soluzione di Alginato 3,5% ad alta viscosità, alla quale sono state aggiunte le cellule negli esperimenti successivi.

L'introduzione di cellule NHAC ha introdotto notevoli difficoltà legate alla necessità di lavorare in un ambiente controllato e sterile. Gli *scaffolds* sono stati quindi prodotti, nella totalità del processo, all'interno di una cappa biologica facendo uso di una stampante 3D Regemat posta al suo interno.

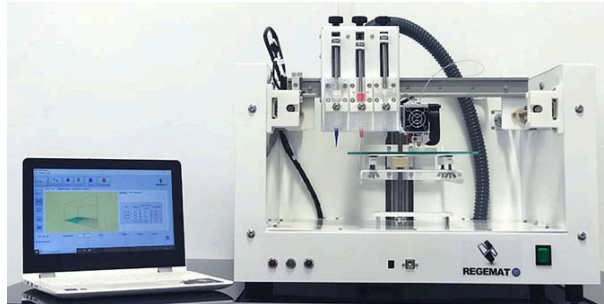


Figura 30 Sistema di stampa Regemat

I nuovi *scaffolds* sono stati quindi prodotti con le seguenti condizioni di stampa per la *Bioprinter Regemat*:

- Temperatura: 25°C (ambiente);
- Diametro estrusore: 0.58 mm (ago rosa);
- Velocità di movimento: 20 mm/sec;
- Velocità di riempimento: 5 mm/sec;
- Velocità perimetro/*skirt*: 11 mm/sec;
- Altezza del layer: 0.25 mm;
- Dimensioni *scaffold* 15 mm x15 mm x 1-5 mm;

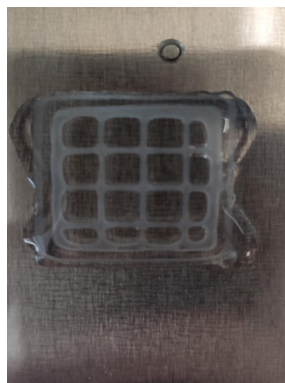


Figura 31 Scaffold di Alginato 3,5% ad alta viscosità stampato con Bioprinter Regemat, immerso nella soluzione reticolante di CaCl₂

Come già citato in precedenza, l'estrusione della soluzione dall'ugello implica la presenza di uno sforzo di taglio sulle cellule ed è proprio questo sforzo che evidenzia lo svantaggio di questa tecnologia di stampa. Risulta così fondamentale identificare l'effetto dell'intero processo sull'attività cellulare. Per tale ragione si sono svolti dei test per valutare la vitalità delle cellule come il *live/dead* test per il quale si è fatto uso, in prima analisi, di diverse concentrazioni di EthD-1 (0.1 μ M, 1 μ M, 5 μ M). I risultati emersi non hanno evidenziato sostanziali differenze nelle immagini ottenute attraverso il microscopio a fluorescenza. Si è fatto uso quindi, per il test della vitalità secondo il protocollo *live/dead*, di una concentrazione di 0.5 μ M sia di Calceina che di EthD-1. Il test sulla vitalità delle cellule NHAC si è svolto su un totale di sette campioni: un controllo, un triplicato di idrogel contenente le cellule, e un triplicato di idrogel stampato.

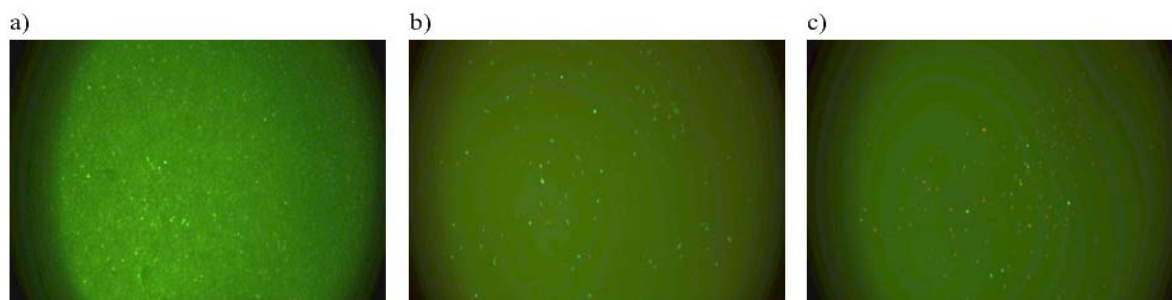


Figura 32 Immagini NACH (P26) al microscopio a fluorescenza Live(verde)/Dead(rosso): a) Immagine controllo; b) immagine NHAC in idrogel; c) immagine NHAC in gel stampato.

Nella figura 32 viene riportato l'effetto dell'intero processo sulle cellule NHAC. La sola presenza dell'idrogel (Fig. 32 b) con relativo mixing comporta una sollecitazione deleteria a carico delle cellule riducendone la percentuale di quelle vive. Un effetto ancora maggiore è presente nel gel stampato. Come previsto l'estrusione provoca uno stress eccessivo per le cellule e ne diminuisce la probabilità di sopravvivenza fino ad un valore percentuale medio del 53%.

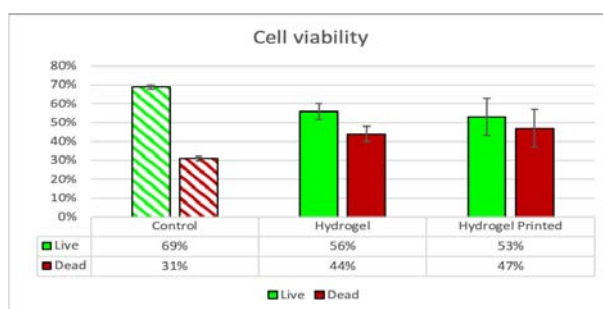


Figura 33 Grafico relativo alle percentuali medie delle cellule sopravvissute al processo di formazione del supporto

Dalle immagini è emerso un ulteriore aspetto importante. Vi è, difatti, una dispersione non sempre omogenea delle cellule NHAC all'interno della soluzione, in particolar modo su alcuni campioni stampati, probabilmente a causa di un addensamento delle cellule provocato dall'uscita forzata dall'ugello.

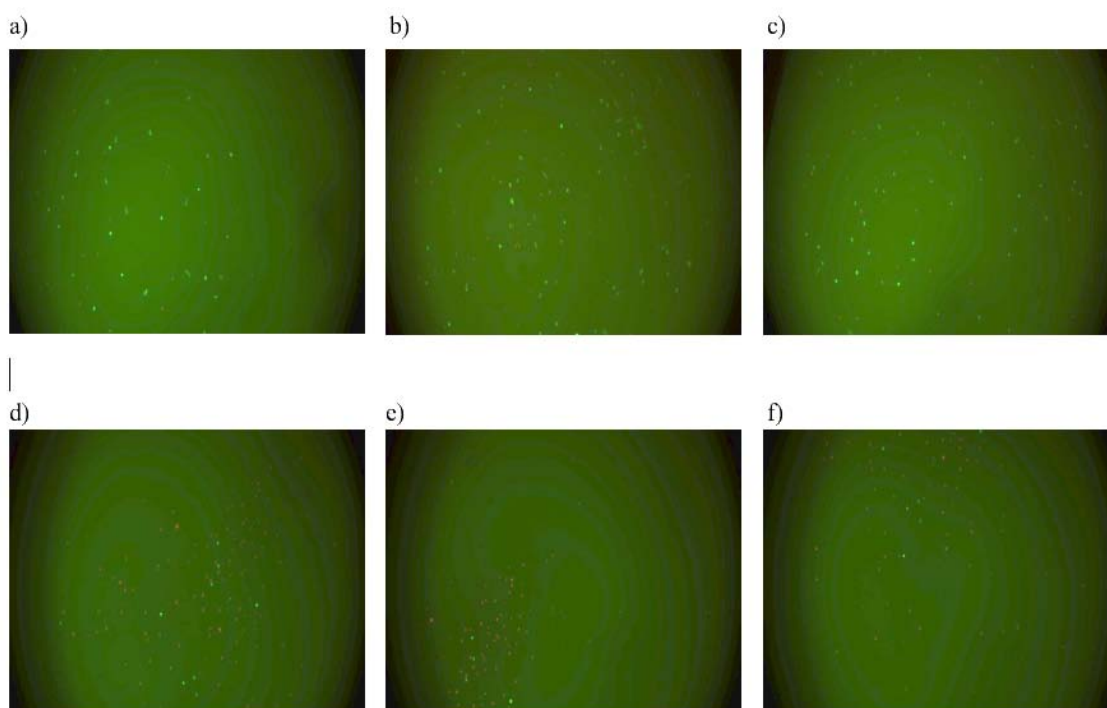


Figura 34 Immagini al microscopio a fluorescenza di due differenti campioni in posizioni diverse. Le immagini (a,b,c) rappresentano la distribuzione delle cellule in un campione contenente solo il gel. Le immagini (d,e,f) rappresentano la distribuzione in un campione stampato

Un ulteriore interessante risultato è stato ottenuto con l'aggiunta del peptide auto-assemblante DAR-16 (0,2% v/v) con concentrazione di 250 μ M. Dal punto di vista reologico, la piccola quantità di peptide introdotta non ha evidenziata alcuna variazione significativa della viscosità.

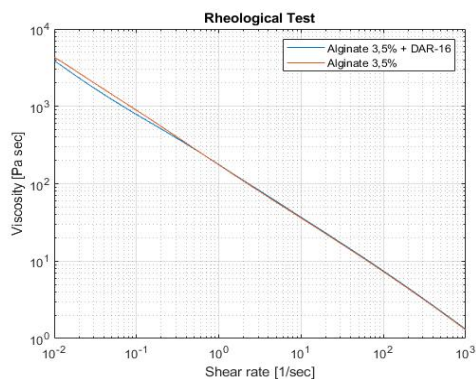


Figura 35 Risultati delle prove reologiche effettuate su campioni di alginato 3,5% in DMEM completo in presenza ed in assenza del peptide DAR-16

Dal punto di vista biologico, invece, l'introduzione del DAR-16 ha evidenziato una variazione di comportamento tra i campioni di idrogel contenenti il peptide e quelli in cui questo è assente.

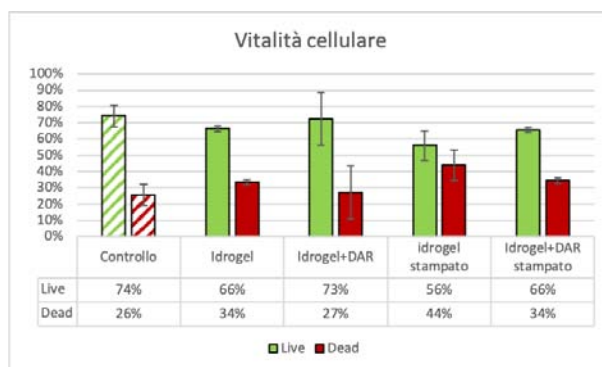


Figura 36 Grafico relativo alle percentuali medie delle cellule sopravvissute al processo di formazione del supporto in presenza e in assenza del peptide DAR 16

Come si evince da figura (36) l'utilizzo del peptide auto-assemblante DAR-16 puro comporta un leggero aumento della vitalità delle cellule sia all'interno del solo idrogel

(+7%) sia in quello stampato, in prima analisi manualmente (+10%), non evidenziando, tuttavia, alcuna significatività dal punto statistico (analisi svolta secondo *Student's T test*). Oltre alla vitalità delle cellule, prima e dopo la stampa, si è voluto misurare quella che è l'attività cellulare nel tempo. La misura si è effettuata dopo 24h e 48h dalla formazione del gel su campioni privi del peptide e su campioni arricchiti col peptide puro DAR-16, prima e dopo stampa.

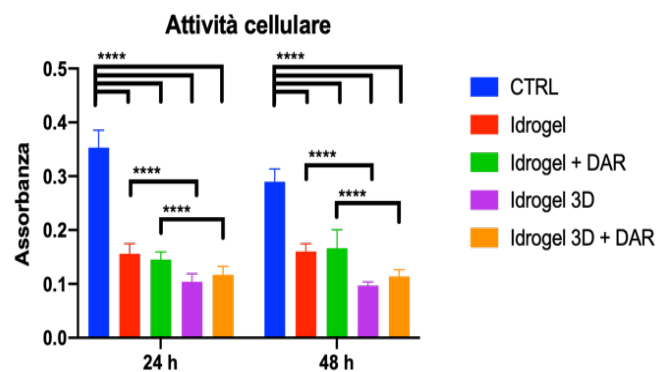


Figura 37 Analisi assorbanza "Alamar Blue assay" su campioni privi e arricchiti col peptide prima e dopo la stampa a tempi di 24h e 48h e analisi statistica secondo test One Way Anova seguito da Tukey's multiple comparison test.
**** $p \text{ value} < 0,0001$

Come si evince da figura (37), la sola introduzione delle cellule NHAC all'interno di un idrogel, nel complesso, evidenzia una diminuzione dell'attività cellulare, rappresentata da una diminuzione di assorbanza. Il processo di stampa sembrerebbe incidere ulteriormente, in maniera negativa. Confrontando i risultati ottenuti, i campioni contenenti la sequenza peptidica evidenziano un leggero incremento dell'attività biologica delle cellule. Dal punto di vista statistico non vi è alcuna differenza significativa tra i risultati ottenuti analizzando i campioni privi e arricchiti del peptide. Tuttavia, vi è una differenza significativa analizzando i risultati in funzione del processo (prima e dopo stampa) e in funzione del riferimento.

Conclusioni

Con questo lavoro di tesi, si è voluto mettere in pratica le idee di base della *medicina rigenerativa*, applicando quelli che sono i criteri dell'ingegneria tissutale.

Attraverso la tecnica di stampa 3D biologica, si è voluto ricreare, in laboratorio, un sistema di supporto tridimensionale a base di idrogeli e cellule, in grado di mimare quanto più possibile il comportamento di un tessuto cartilagineo.

La tecnica utilizzata per la produzione dello *scaffold*, pur dimostrando la possibilità di ottenere supporti di grosso spessore (4 mm), ha evidenziato una grossa limitazione per quanto concerne la vitalità delle cellule, sia in fase di preparazione del gel sia in fase post-stampa. Difatti, l'intero processo di preparazione e di stampa va a danneggiare la struttura cellulare a seguito di sollecitazione dovute al *mixing* della soluzione e allo *shear rate* prodotti tramite micro-estrusione.

Si è sopperito, in parte, a questa limitazione attraverso l'introduzione, in soluzione, di una piccola quantità di peptide auto-assemblante, il quale ha evidenziato, sui campioni analizzati, un incremento della vitalità delle cellule, oltre ad un leggero incremento della proliferazione dopo stampa rispetto i campioni privi del peptide.

I test condotti su una soluzione di Alginato hanno avuto lo scopo di definire le dinamiche di processo per la produzione di uno *scaffold* tramite stampa biologica. In prospettiva futura, si vuole quindi sostituire la soluzione di alginato con soluzioni di altri materiali che possono dare un diverso contributo dal punto di vista meccanico del supporto, ma anche dal punto di vista biologico, come una maggiore biocompatibilità. Un possibile esempio è l'utilizzo di un *blend* polimerico di acido ialuronico e chitosano, così come può essere l'utilizzo di materiali caricati con nanoparticelle. Si vuole, inoltre, indagare su quelli che sono gli effetti sull'idrogel di concentrazioni differenti di peptide DAR-16 e valutare gli effetti dell'introduzione di segnali biochimici specifici legati covalentemente allo stesso peptide DAR-16.

Bibliografia

- P. Zhao; H. Gu; H. Mi; C. Rao; J. Fu; L.S. Turng; “*Fabrication of scaffolds in tissue engineering: A review*”, 2018, 13(1): 107-119;
- P. Deb; A. B. Deoghare; A. Borah; E. Barua; S. Das Lala; “*Scaffolds development using Biomaterials: A review*”, Materials Today: proceedings, 2018, 12909-12919;
- S. V. Murphy; A. Atala; “*3D bioprinting of tissue and organs*”, Nature Biotechnology, 2014, 32(8): 773-785;
- J. Liu; L. Li; H. Suo; M. Yan; J. Yin; J. Fu; “*3D printing of biomimetic multi-layered GelMA/nHA scaffold for osteochondral defect repair*”, Materials and Design, 2019, 171: 1-9;
- M. Gao; H. Zhang; W. Dong; J. Bai; B. Gao; D. Xia; B. Feng; M. Chen; X. He; M. Yin; Z. Xu; N. Witman; W. Fu; J. Zheng; “*Tissue-engineered trachea from a 3D-printed scaffold enhances whole-segment tracheal repair*”, Scientific Reports, 2017, 1-11;
- H. G. Yi; Y. J. Choi; J. W. Jung; J. Jang; T. H. Song; S. Chae; M. Ahn; T. H. Choi; J. W. Rhie; D. W. Cho; “*Three-dimensional printing of a patient-specific engineered nasal cartilage for augmentative rhinoplasty*”, Journal of Tissue Engineering, 2019, 10: 1-14;
- X. Wang; Q. Ao; X. Tian; J. Fan; H. Tong; W. Hou; S. Bai; “*Gelatin-based Hydrogel for organ 3D Bioprinting*”, Polymers, 2017, 1-24;
- T. Zehnder; B. Sarker; A. R. Boccaccini; R. Detsch; “*Evaluation of an alginate-gelatine crosslinked hydrogel for bioplotting*”, Biofabrication, 2015, 7(2): 1-27;
- R. Langer; J. P. Vacanti; “*Tissue Engineering*”, Science, 1993, 260: 920-926;
- X. Wang; Y. Yan; F. Liu; Z. Xiong; R. Wu; R. Zhang; Q. P. Lu; “*Preparation and characterization of a collagen/chitosan/heparin matrix for an implantable bioartificial liver*”, J. Biomaterial Sci. Polym., 2005, 16: 1063-1080;
- X. Wang; “*Intelligent freeform manufacturing of complex organs*”; Artif. Org., 2012, 36: 951-961;

- X. Zhao; L. Liu; J. Wang; Y. F. Xu; W. M. Zhang; G. Khang; X. Wang; “*In vitro vascularization of a combined system based on a 3D bioprinting technique*”, *Journal of Tissue Engineering regenerative medicine*, 2014, 10: 833-842;
- W. Xu; X. Wang; Y. Yan; R. Zhang; “*Rapid prototyping of polyurethane for the creation of vascular systems*, *J. Bioact. Compat. Polym.*, 2008, 23: 103-114;
- S. Zhang; “*Emerging biological materials through molecular self-assembly*”, *Biotech. Adv.*, 2002, 20: 321-339,
- F. Turella; “*Nano-Scaffold di polimeri naturali e sintetici per l’ingegneria tessutale: preparazione e caratterizzazione*”, *Laurea Specialistica in Scienza ed Ingegneria dei Materiali, Dipartimento di Ingegneria Meccanica, settore Materiali, Padova (2008)*;
- P. Brun; A. Zamuner; A. Peretti; J. Conti; G. M. L. Messina; G. Marletta; M. Dettin; “*3D Synthetic Peptide-based Architectures for the Engineering of the Enteric Nervous System*”, *Scientific Report*, 2019, 9;
- J. Uggeri; R. Gatti; S. Belletti; R. Scandroglio; R. Corradini; B. M. Rotoli; G. Orlandini; “*Calcein-AM is a detector of intercellular oxidative activity*”, *Histochemistry and cell biology*, 2000, 122: 499-505;
- R. P. Haugland; I. C. MacCoubrey; P. L. Moore; “*Dual-fluorescence cell viability assay using Ethidium Homodimer and Calcein AM*”, *Molecular Probes Inc.*, 1994, 783;
- F. De Sio; M. Grimaldi; R. Loiudice; “*Introduzione all’HPLC e metodi analitici per alimenti vegetali*”, *ResearchGate*, 1999;
- G. R. Nakayama; M. C. Caton; M. P. Nova; Z. Parandoosh; “*Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro*”, *J. Immunol Methods*, 1997, 204: 205-208;
- V. V. Nikolaychik; M. M. Samet; P. I. Lelkes; “*A new method for continual quantitation of viable cells on endothelialised polyurethanes*”; *J. Biomater. Sci. Polym.*, 1996, 7: 881-191;
- M. M. Nociari; A. Shalev; P. Benias; C. Russo; “*A novel one-step, highly sensitive fluorometric assay to evaluate cell-mediated cytotoxicity*”, *J. Immunol. Methods*, 1998, 213: 157-167;

- J. M. Anderson; “*The future of biomedical materials*”, J. Mater. Sci.: Mater Med, 2006, 17: 1025-1028;
- A. R. Brown; J. B. Phillips; “*Cell responses to biomimetic protein scaffolds used in tissue repair and engineering*”, Int Rev Cytol, 2007, 262: 75-150;
- R. B. Langer; J. P. Vacanti; “*Tissue Engineering*”, Science, 1993, 260(5110): 920-926;
- C. M. Agrawal; R. B. Ray; “*Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering*”, J. Biomed. Mater Res., 2001, 55: 141-150;
- M. Britteberg; A. Lindhal; A. Nilsson; C. Ohlsson; O. Isaksson; L. Peterson; “*Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation*”, New England Journal of Medicine, 1994, 331: 889-95;

Ringraziamenti

Al termine di questo percorso accademico e al raggiungimento di questo mio importante traguardo, desidero ringraziare tutte le persone che mi hanno accompagnato in questa avventura. Ringrazio, innanzitutto, la Prof.ssa Dettin e la Prof.ssa Di Silvio per avermi ospitato presso i loro rispettivi laboratori e per avermi dato modo di crescere sia a livello accademico sia a livello personale. Ringrazio l'Ing. Annj Zamuner per avermi supportato in questi anni, dalla mia laurea triennale ad oggi e per essere sempre stata disponibile per ogni tipo di aiuto. Ringrazio il Dott. Fabio Pieretti per avermi accompagnato, seppur per pochi mesi, nella mia avventura patavina. Ringrazio tutti i compagni e amici di laboratorio, Anna, Chiara, Stefano, Jacopo, Annalisa, François, Juliette e Liyang. Un ringraziamento alla Cornaro e a tutti gli amici di tutto il mondo, incontrati in questi anni; in particolare Francesco, Gabriele, Giuliana, Valerio, Carlo, Chiara, Maria, Felix, e a Marco. Un ringraziamento particolare va a Letizia.

Un enorme grazie va alla mia famiglia, in particolare a mamma, a papà, a Luca e a Charlie, che mi hanno supportato in ogni mia decisione e che mi hanno permesso di giungere fino a qui.