



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI
FEDERICO II

DOTTORATO DI RICERCA
IN
INGEGNERIA CHIMICA, DEI MATERIALI E DELLA PRODUZIONE
XIX CICLO

INTERAZIONE CELLULA-MATERIALE

Coordinatore
Ch.mo Prof. Nino Grizzuti

Candidato
Dott.ssa Daniela Guarnieri

Tutor
Ch.mo Prof. Paolo A. Netti

Ai miei genitori

CAPITOLO 1	
Introduzione e Scopo del lavoro	6
CAPITOLO 2	
Interazione cellula-matrice in vivo	
Controllo e regolazione delle funzioni cellulari	10
1 Interazione cellula-matrice in vivo	11
2 Struttura e funzione della matrice extracellulare (ECM)	11
3 Adesione cellulare	13
4 Migrazione cellulare	16
5 Meccanismi di trasporto transmembrana	19
5.1 La membrana cellulare	19
5.2 Meccanismi di internalizzazione	20
5.2.1 La diffusione	21
5.2.2 L'osmosi	22
5.2.3 Trasporto mediato da vescicole	23
5.2.3.1 La fagocitosi	24
5.2.3.2 La pinocitosi	25
5.2.3.3 L' endocitosi	25
CAPITOLO 3	
Interazione cellula-matrice in vitro	
Ruolo dei biomateriali nella regolazione delle funzioni cellulari	26
1 Interazione cellula-matrice in vitro	27
2 Modulazione delle caratteristiche chimiche del materiale	27
2.1 Natura del materiale	27
2.2 Bioattivazione	28
3 Modulazione delle caratteristiche fisiche del materiale	32
3.1 Importanza delle proprietà meccaniche nella progettazione di biomateriali	32
3.2 Forma del materiale	33
3.3 Dimensione del materiale: le nanoparticelle	35
3.3.1 Definizione	35
3.3.2 Applicazioni delle nanoparticelle in diagnostica e terapia	35
3.3.2.1 Risonanza magnetica	36
3.3.2.1.1 Le nanoparticelle come mezzi di contrasto per la risonanza magnetica	38
3.3.2.2 Drug delivery	40
3.3.2.2.1 Applicazioni delle nanoparticelle per il drug delivery alla barriera ematoencefalica (BEE)	45
3.3.2.3 Gene therapy	46
3.3.2.4 Ipertermia	48
CAPITOLO 4	
Risposta cellulare a materiali naturali	
Effetto della composizione della matrice sul differenziamento di cellule staminali embrionali	52
INTRODUZIONE	53

MATERIALI E METODI	54
1 Materiali	54
2 Preparazione dei gel semi-interpenetrati (semi-IPN) di collagene-fibronectina e collagene-laminina	54
3 Sonda diffondente	54
4 Immunofluorescenza indiretta	55
5 Microscopia confocale (CLSM)	55
6 Microscopia elettronica a scansione ambientale (ESEM)	57
7 Microscopia elettronica a trasmissione (TEM)	58
8 Misure reologiche	58
9 Misure del coefficiente di diffusione	59
10 Cellule staminali embrionali	59
11 Formazione dei corpi embrioidi a partire da cellule staminali	59
12 DAPI (40,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride)	60
13 Istochimica	60
14 Determinazione del differenziamento cardiaco	60
RISULTATI	60
1 Analisi morfologica di EBs in gel di collagene	60
2 Effetto delle proprietà fisiche e della composizione dello scaffold sulla cavitazione degli EBs	61
3 Analisi strutturale dei gel di collagene 2.4 e 1.2 mg/ml.	62
4 Effetto di FN e LM sul differenziamento di EBs.	63
5 Distribuzione di FN e LM in gel di collagene e in gel semi-interpenetrati (semi-IPNs) di collagene-FN e collagene-LM.	66
6 Analisi morfologica dei gel di collagene e dei semi-IPNs di collagene-FN e collagene-LM	67
6.1 ESEM	67
6.2 TEM	68
7 Analisi reologiche dei gel di collagene e dei semi-IPNs di collagene-FN e collagene-LM	71
8 Analisi FRAP dei gel di collagene e dei semi-IPNs di collagene-FN e collagene-LM	72
DISCUSSIONE	72
CAPITOLO 5	
Risposta cellulare a materiali sintetici bioattivati	
Effetto delle proprietà meccaniche e biochimiche sull'attività cellulare	76
INTRODUZIONE	77
MATERIALI E METODI	80
1 Preparazione dei Self Assembled Monolayers (SAMs)	80
2 Preparazione degli idrogeli di PEG diacrilato (PEGDA) bioattivati con RGD	81
2.1 Protocollo di preparazione degli idrogeli	81
3 Analisi FTIR-ATR	82
3.1 Lo Spettrofotometro IR a Trasformata di Fourier (FTIR)	84
3.2 Preparazione dei campioni per l'analisi ATR dei PEG-SAMs	85
3.3 Preparazione dei campioni per l'analisi ATR degli idrogeli	85
4 Prove di adesione cellulare sugli idrogeli di PEG3400	86
5 Osservazioni al microscopio ottico	86
6 Immunolocalizzazione dei contatti focali e delle fibre da stress di actina	86
7 Saggio di vitalità e proliferazione cellulare	87

7.1 Descrizione del saggio	88
8 Preparazione del gradiente di PEG-RGD	89
9 Caratterizzazione del gradiente	90
10 Esperimenti di migrazione cellulare	93
10.1 Modello interpretativo	93
10.2 Tecnica e apparato sperimentale	95
10.3 Preparazione dei campioni per gli esperimenti di migrazione sugli idrogeli i monostrati di PEG	99
10.4 Fase sperimentale	99
10.5 Analisi dei dati	101
RISULTATI	101
1 PEG-SAMs	101
1.1 Caratterizzazione delle superfici	101
1.2 Osservazioni al microscopio ottico della morfologia cellulare	102
1.3 Localizzazione dei contatti focali e degli elementi del citoscheletro	104
1.4 Proliferazione cellulare	105
1.5 Risultati degli esperimenti di migrazione cellulare	106
2 IDROGELI DI PEG	109
2.1 Caratterizzazione delle superfici	109
2.2 Adesione cellulare	110
2.3 Risultati degli esperimenti di migrazione cellulare	113
3 GRADIENTI DI PEG-RGD	115
3.1 Adesione cellulare	115
DISCUSSIONE	115
CAPITOLO 6	
Risposta cellulare a materiali nanometrici	
Valutazione dell'uptake di nanoparticelle di polistirene da parte di cellule endoteliali	120
INTRODUZIONE	121
MATERIALI E METODI	122
1 Colture cellulari	122
2 Nanoparticelle utilizzate	122
3 Esperimento d'internalizzazione per l'analisi qualitativa	123
4 Acquisizione delle immagini al CLSM	124
5 Analisi qualitativa delle immagini con il software Metamorph	125
6 Esperimento d'internalizzazione per l'analisi quantitativa	128
7 Acquisizione dei dati con lo spettrofluorimetro	129
RISULTATI	132
1 Risultati analisi qualitativa	132
2 Risultati analisi quantitativa	135
DISCUSSIONE	139
CAPITOLO 7	
Conclusioni	141
Bibliografia	143

-CAPITOLO 1-
INTRODUZIONE E SCOPO DEL LAVORO

Le più importanti discipline biomediche, quali l'ingegneria dei tessuti, la veicolazione di farmaci, la terapia genica e la diagnostica stanno recentemente sviluppando materiali innovativi capaci di controllare e guidare le risposte cellulari per specifiche applicazioni.

Per quanto riguarda l'ingegneria dei tessuti, ad esempio, il cui scopo primario è quello di rigenerare un tessuto danneggiato o ripristinare una funzione biologica mancante, avvalendosi di due componenti fondamentali, le cellule e lo scaffold, il materiale, oltre a svolgere funzione di supporto per il neo-tessuto in formazione, deve anche apportare segnali specifici al fine di guidare le cellule nel processo di rigenerazione. Deve provvedere innanzitutto all'adesione delle cellule al substrato, condizione necessaria affinché si verifichino i fenomeni di migrazione delle cellule da e verso lo scaffold, proliferazione cellulare, biosintesi, o differenziamento, qualora si stia parlando di cellule staminali.

Nel caso del "drug delivery" o della "gene therapy", il materiale deve avere una duplice funzione: deve fungere da vettore, cioè mediare la veicolazione del farmaco o del materiale genetico all'interno delle cellule, favorendone il passaggio attraverso le barriere fisiologiche (ad esempio la membrana plasmatica o la barriera emato-encefalica BEE) ed evitandone la degradazione e l'eliminazione, ma, soprattutto, deve agire in maniera specifica, cioè la veicolazione deve essere mirata solo alle cellule bersaglio e non agire a livello sistemico, onde evitare possibili effetti collaterali.

La specificità del riconoscimento cellula-materiale sta alla base anche delle recenti applicazioni dei biomateriali nella diagnostica e nella terapia dei tumori. Sempre di più si sta pensando, infatti, di impiegare materiali nanometrici (ad es. nanoparticelle paramagnetiche di ossido di ferro) come agenti di contrasto per la risonanza magnetica o per la radioterapia. Anche in questo caso, si desidera un materiale capace di riconoscere solo il tipo cellulare bersaglio (cioè la cellula tumorale) e, quindi, un'interazione cellula-materiale specifica.

Risulta evidente come, conoscere i meccanismi che regolano l'interazione cellula-materiale, al fine di modulare le risposte cellulari, sia di fondamentale importanza per ogni tipo di applicazione in campo biomedico.

Esistono diversi tipi di interazione che possono instaurarsi tra la cellula e il materiale. Per effetto di cariche superficiali o interazioni idrofobiche, ad esempio, la cellula può interagire con il materiale. Da questo tipo di interazioni, però, non si ottiene nessuna risposta biologica. Affinché l'interazione cellula-materiale attivi una particolare funzione cellulare (quali ad esempio adesione, migrazione, biosintesi, ecc.), cioè si abbia un "riconoscimento biologico" del materiale, è necessaria l'attivazione di una cascata di segnali capace di stimolare una risposta cellulare specifica. Il riconoscimento biologico, ovvero l'interazione, devono

avvenire tra due molecole, un ligando e un recettore, capaci di formare un complesso attivo che genera un pathway di segnali dall'esterno all'interno della cellula, in grado di modificare la cellula stessa e l'ambiente che la circonda.

Esistono numerosi recettori cellulari che rispondono, a loro volta, a numerosi ligandi (segnali). I recettori si trovano preferenzialmente esposti sulla membrana plasmatica, anche se ne esistono di intracellulari (come quelli per gli ormoni steroidei). I segnali riconosciuti da tali recettori possono essere distinti in fattori solubili (ad esempio fattori di crescita, citochine, chemochine, ormoni) e fattori insolubili (componenti della matrice extracellulare (ECM) quali collagene, elastina, fibronectina, laminina o fattori legati alla ECM quale BMP).

Inoltre, le cellule sono sottoposte contemporaneamente a diversi stimoli provenienti dal microambiente che le circonda, per cui, molto spesso è la combinazione di tutti questi stimoli a determinare l'attivazione di una specifica funzione cellulare. Tutto ciò, ovviamente, implica una ulteriore complessità nel comprendere i meccanismi dell'interazione cellula-materiale.

Lo scopo del seguente progetto di dottorato è stato di chiarire i meccanismi che si trovano alla base del processo di interazione cellula-materiale. In particolare, lo studio è stato focalizzato sul delucidare i processi di riconoscimento biologico del materiale da parte delle cellule, utilizzando diversi modelli sperimentali, in modo da chiarire come, diversi parametri, quali caratteristiche chimico-fisiche e meccaniche del materiale, potessero influenzare le risposte biologiche di diverse tipologie di cellule. Nello specifico, il lavoro della seguente tesi è schematizzabile in tre grandi studi atti a chiarire aspetti diversi dell'interazione cellula-materiale.

Il primo studio ha riguardato la caratterizzazione della risposta cellulare a materiali naturali. In particolare, è stato valutato l'effetto della composizione della matrice nello sviluppo embrionale. Per tale studio sono stati utilizzati, come modello sperimentale, corpi embrioidi (EBs) coltivati in matrici tridimensionali di gel di collagene e gel semi-interpenetrati di collagene-fibronectina e collagene-laminina.

Il secondo studio ha investigato il ruolo svolto dalle proprietà meccaniche e biochimiche del materiale nei processi di adesione e migrazione cellulari. Modelli sperimentali per tale studio sono stati mostrati e idrogeli di polietilenglicole opportunamente funzionalizzati con molecole bioattive. Con tali modelli è stato possibile modulare indipendentemente le proprietà meccaniche e quelle biochimiche al fine di valutare la risposta cellulare a queste due variabili.

Il terzo e ultimo studio ha focalizzato l'attenzione sulla risposta cellulare a materiali di dimensioni nanometriche. In particolare, è stata caratterizzata l'internalizzazione di nanoparticelle di polistirene di diverse dimensioni in cellule endoteliali.

Al fine di comprendere meglio gli studi effettuati nel seguente lavoro di tesi, nei prossimi capitoli saranno ampiamente descritti i meccanismi che controllano le funzioni cellulari in vivo e verrà fatta una panoramica generale dei biomateriali utilizzati fino ad ora, prima di passare alla parte sperimentale e alla discussione dei risultati ottenuti.

-CAPITOLO 2-
INTERAZIONE CELLULA-MATRICE IN VIVO
CONTROLLO E REGOLAZIONE DELLE FUNZIONI
CELLULARI

1 Interazione cellula-matrice in vivo

In vivo la cellula riconosce l'ambiente che la circonda ed interagisce con esso. Il microambiente, in cui sono immerse le cellule, è rappresentato dalla Matrice Extra-Cellulare (ECM), un'entità complessa, composta da numerose proteine che svolgono funzioni strutturali e di segnale. L'interazione tra cellula e ECM favorisce l'adesione e scatena una cascata di segnali intracellulari che permettono la crescita, la proliferazione ed il differenziamento. La ECM, perciò, non rappresenta solo l'impalcatura meccanica per l'architettura dei tessuti, ma gioca un ruolo chiave nella regolazione di alcune delle più importanti funzioni cellulari [Giancotti, 1999; Schoenwaelder, 1999; Humphries, 1998].

2 Struttura e funzione della matrice extracellulare (ECM)

Una parte sostanziale del volume dei tessuti è costituita dallo spazio extracellulare, in larga misura riempito da un'intricata rete di macromolecole che costituiscono la matrice extracellulare, in cui le cellule vivono, proliferano e migrano. Essa comprende una varietà di proteine e polisaccaridi secreti localmente, che si aggregano in un reticolo organizzato in maniera compatta e connesso alla superficie della cellula che l'ha prodotto.

Le variazioni della quantità relativa dei vari tipi di macromolecole costituenti la matrice extracellulare e il modo in cui in esse si assemblano, originano una diversità di forme, ciascuna adatta ai requisiti funzionali di un diverso tessuto.

Fino a qualche tempo fa si pensava che la matrice extracellulare dei vertebrati servisse principalmente da impalcatura relativamente inerte, in grado di stabilizzare la struttura fisica dei tessuti. Ormai, invece, è chiaro che la matrice gioca un ruolo ben più attivo e complesso nella regolazione del comportamento delle cellule, influenzandone sviluppo, migrazione, proliferazione e funzione metabolica.

La ECM possiede una complessa conformazione molecolare (figura 1).

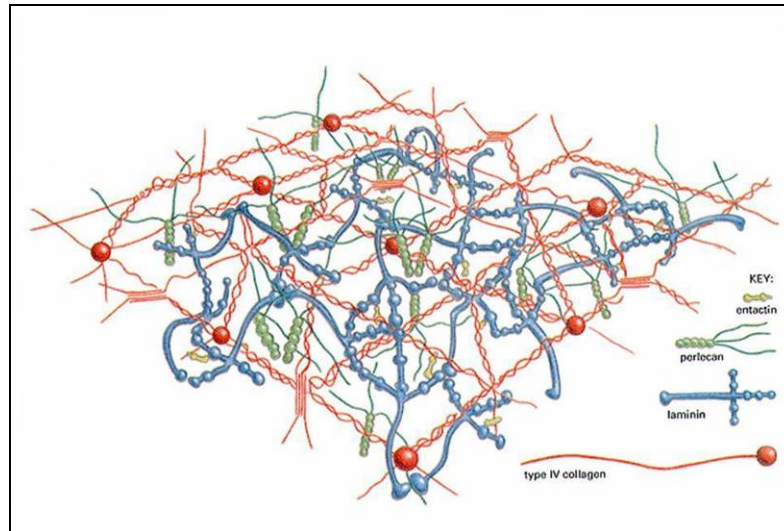


Figura 1: Matrice extracellulare

Le due principali classi di macromolecole che compongono la matrice sono proteoglicani (figura 2) e proteine fibrose; queste ultime appartengono a due gruppi: uno con funzione principalmente strutturale (collagene (figura 3) ed elastina) e uno con funzione principalmente adesiva (per esempio fibronectina (figura 4) e laminina).

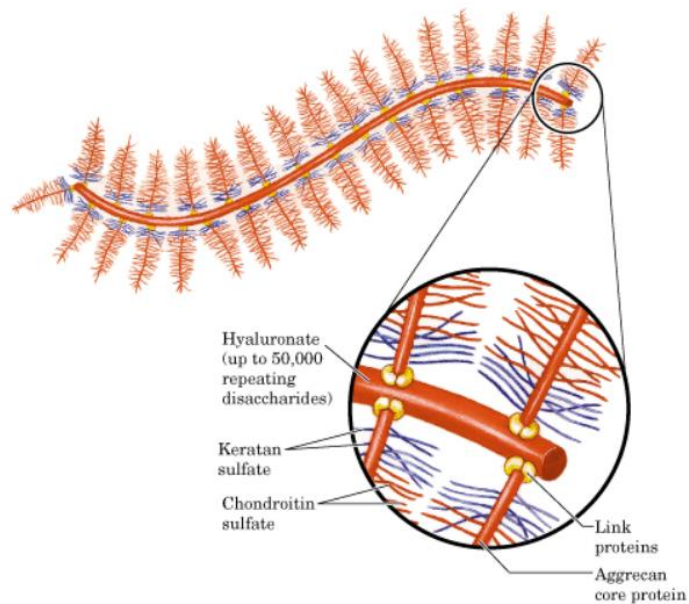


Figura 2: Struttura di un proteoglicano

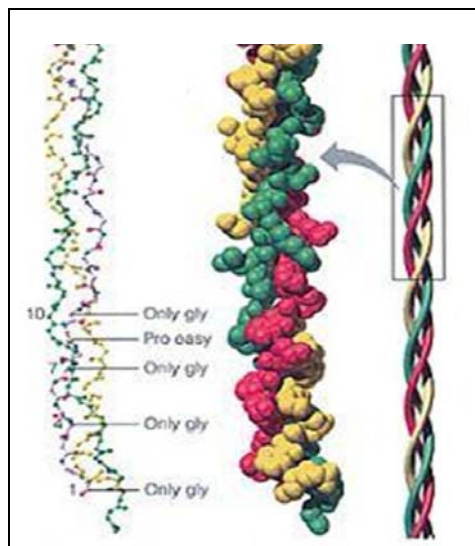


Figura 3: Struttura ad elica di una fibra di collagene

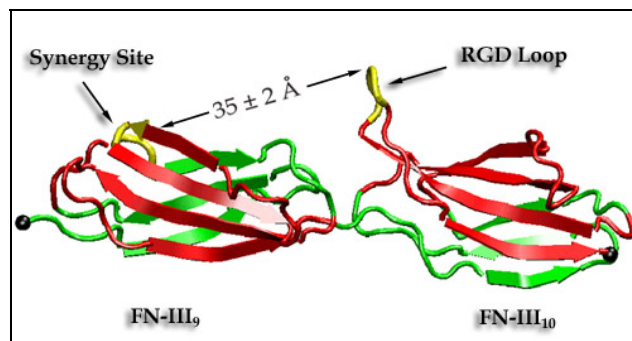


Figura 4: Fibronettina

Le molecole dei proteoglicani formano, nei tessuti connettivi, una sostanza gelatinosa e fortemente idratata, in cui sono immerse le proteine fibrose: il gel di polisaccaridi resiste alle forze compressive esercitate sulla matrice, mentre le fibre di collagene assicurano una resistenza alla trazione. Le proteine di adesione, invece, hanno il compito di organizzare la matrice, ma soprattutto di provvedere ad un'interfaccia stabile con le cellule.

Tutto ciò assume un aspetto fondamentale per l'evoluzione dell'intero tessuto dato che le cellule, grazie a tale contatto, hanno la possibilità di muoversi all'interno della ECM, ossia di migrare in ogni suo punto, rimodellandola e svolgendo le proprie attività biosintetiche [Beningo et al., 2004].

3 Adesione cellulare

La maggior parte delle cellule dell'organismo umano cresce adesa alla matrice extracellulare. L'adesione cellulare è un processo indispensabile per la regolazione di tutte le più importanti funzioni cellulari. I punti di contatto tra le cellule e la ECM vengono definiti Focal Adhesions (FA) o Focal Contacts (FC). I FA sono degli organelli specializzati, dalla struttura piatta ed allungata, che occupano un'area di pochi micron quadrati e che sono spesso localizzati alla periferia della cellula. Nella loro porzione citoplasmatica, i FA sono associati a fasci di microfilamenti di actina (stress fibres), una componente del citoscheletro che rappresenta l'impalcatura della cellula. I FA sono dei siti di ancoraggio con i quali la ECM è legata indirettamente al citoscheletro di actina attraverso una complessa rete di "proteine ancora" di membrana.

Le “proteine ancora” svolgono sia una funzione di segnale per l’attivazione di “pathways” metabolici specifici, come proteine tirosina-chinasi, serina-treonina chinasi, GTPasi, fosfatasi ed altri enzimi, sia una funzione strutturale di associazione a fasci di fibre di actina, come la tensina, la vinculina, la paxillina, l’ α -actinina, la parvina e la talina [Zamir, 2001]. Le “proteine ancora” interagiscono con la porzione citoplasmatica di proteine transmembrana che fungono da ponte tra l’ambiente intracellulare e la ECM.

Le proteine transmembrana svolgono la funzione di recettori capaci di integrare i segnali extracellulari con quelli intracellulari e, per tale motivo, queste proteine prendono il nome di integrine.

Le Integrine sono una famiglia di glicoproteine eterodimeriche transmembrana, composte da due subunità, α e β , legate tra loro non covalentemente [Hynes, 1992; Schwartz et al., 1995]. Si conoscono 8 subunità β e 16 subunità α , combinate tra loro in 24 differenti eterodimeri [Van der Flier, 2001], che sono il risultato di splicing alternativo del trascritto dello stesso gene.

<i>Integrine</i>	<i>Ligando</i>	<i>Sito di legame</i>
β_1	α_1	Collagene (I e IV), laminina
	α_2	Collagene (I- V e VI), laminina
	α_3	Fibronettina, collagene I, laminine
	α_4	Fibronettina (IICS) VCAM-1
	α_5	Fibronettina (10 th FNIII)
	α_6	Laminine
	α_7	Laminine
	α_8	Laminine
	α_9	Tenascina
	α_{10}	
	α_V	Fibronettina
β_1	α_L	ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3
	α_M	C3bi, fibrinogeno, fattore X, ICAM-1
	α_X	Fibrinogeno, C3bi
β_3	α_{lib}	Fibrinogeno, fibronettina, von Willebrandt factor, vitronettina, trombospondina
	α_V	Vitronettina, Fibrinogeno, von Willebrandt factor, trombospondina, fibronettina, osteopontina
β_4	α_6	Laminina
β_5	α_V	Vitronettina
β_6	α_V	Fibronettina
β_7	α_4	VCAM-1, MadCAM-1
	α_E	E- caderina
β_8	α_V	

Tabella 1. La famiglia delle integrine

Il processo di legame delle integrine al ligando è chiamato “inside-out signaling” [Hynes, 1992]. Il legame delle integrine al proprio ligando sulla membrana cellulare, ne modifica l’affinità/avidità per il ligando stesso. Per cui, le integrine passano da uno stato di recettori a

bassa affinità/avidità con il ligando ad uno stato di recettori ad alta affinità/avidità. Questa conversione permette il reclutamento del maggior numero di proteine della ECM che posseggono la sequenza riconosciuta dalle integrine. L' "inside-out signaling" è legato alla diffusione laterale delle integrine nella membrana plasmatica. Gli eventi fondamentali di questo processo sono due: la *modulazione dell'affinità*, che si ottiene con un cambio conformazionale dell'eterodimero con conseguente aumento della forza di legame con il ligando e la *modulazione dell'avidità*, che implica un cambiamento funzionale dell'interazione tra recettore e ligando attraverso interazioni con il citoscheletro che regolano la diffusività dei recettori nella membrana. Infatti, quando la diffusione delle integrine è sufficientemente elevata, le stesse possono clusterizzare nei siti di adesione per aumentare l'avidità cellulare per il ligando [Bazzoni, 1998] (figura 5).

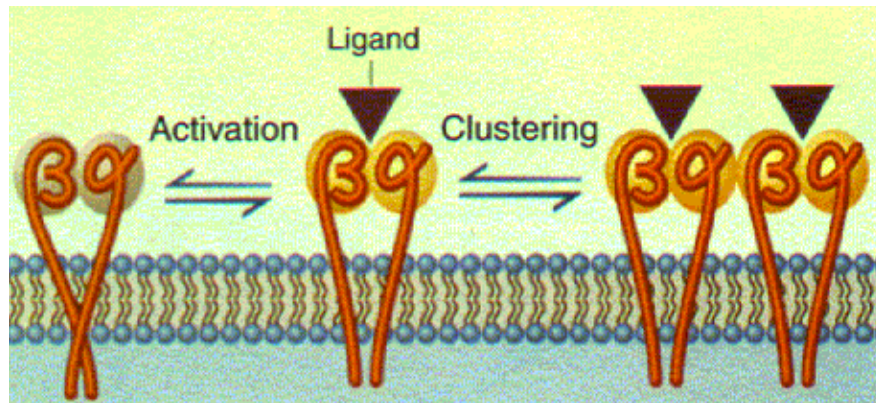


Figura 5: Meccanismo di attivazione e "clusterizzazione" delle integrine

Le integrine controllano il comportamento cellulare attraverso l'interazione con specifici componenti dell'ECM. Fra questi è importante il ruolo della Fibronectina (FN), una proteina che costituisce la ECM. La FN esiste in due forme principali: una solubile, chiamata plasma FN (pFN), presente nel sangue e non reattiva con recettori di adesione, ed un'altra forma multimerica insolubile, chiamata FN cellulare (cFN), altamente adesiva. La cFN viene depositata sotto forma di fibrille nella ECM dai fibroblasti, da cellule epiteliali e da altri tipi cellulari. Entrambe le forme hanno dei precursori simili, ma non identici, che consistono in un dimero di circa 450kDa composto da due subunità identiche di 225kDa [Hynes, 1990], legate da un ponte disolfuro. Ogni subunità contiene circa 2300 amminoacidi ed è fortemente glicosilata. La FN è implicata in un'ampia varietà di proprietà cellulari, come l'adesione cellulare, la morfologia, l'organizzazione del citoscheletro, la migrazione, la differenziazione, la trasformazione oncogenica, la fagocitosi e l'emostasi [Hynes, 1992]. La polimerizzazione della FN nella ECM è fortemente regolata per assicurare che l'informazione adesiva nella ECM sia appropriata. L'informazione adesiva della FN è dovuta alla presenza nella sua

sequenza amminoacidica, di unità ripetitive di tre amminoacidi, Arg-Gly-Asp (RGD), che sono riconosciute specificamente dalle integrine $\alpha_5\beta_1$ e $\alpha_v\beta_3$ [Ruoslahti, 1996].

I FA sono ampiamente studiati per analizzarne la composizione proteica e il meccanismo di formazione. Si possono distinguere tre classi di FA, ognuna caratterizzata da una diversa combinazione di integrine e “proteine ancora” [Zamir, 2001]. I FA “classici”, localizzati di solito alla periferia della cellula, sono costituiti dall’integrina $\alpha_v\beta_3$, dalla vinculina e dalla paxillina. I Fibrillar Adhesions si trovano in una posizione centrale della cellula, associati a fibrille di fibronectina, contengono l’integrina $\alpha_5\beta_1$, la tensina e nessuna o poche fosfotirosine [Zamir, 1999]. Alla periferia della cellula, maggiormente lungo il lamellipodio di cellule in movimento, si formano delle piccole adesioni alla matrice, dette Focal Complexes (FX) [Nobes, 1995]. I FX sono delle strutture a breve emivita, contenenti l’integrina β_3 [Ballestrem, 2001], la vinculina [Rottner, 1996], la paxillina, l’ α -actinina [Laukaitis, 2001] e la fosfotirosina Arp2/3 [DeMali, 2002]. Inoltre, recenti studi, effettuati su fibroblasti, hanno dimostrato che la composizione dei FA cambia se ci si sposta da un sistema di coltura bidimensionale (in piastre di coltura Petri) ad un sistema tridimensionale, come possono essere matrici naturali di collagene [Cukierman, 2001; Yamada, 2003]. I FA rappresentano un sistema modello accreditato per lo studio dei legami strutturali tra la ECM e il citoscheletro e per lo studio dei segnali bidirezionali che si hanno tra le cellule e la ECM, poiché in questi siti si trovano numerose proteine segnale [Burrige, 1996].

4 Migrazione cellulare

L’interazione delle cellule con la matrice cellulare è fondamentale non solo per regolare l’adesione, ma anche per guidare la migrazione cellulare.

In ogni organismo vivente la migrazione cellulare assume un ruolo centrale sia nei processi fisiologici, sia in quelli patologici. L’importanza della migrazione cellulare inizia sin dallo sviluppo embrionale, durante il quale le cellule, migrando, determinano la formazione di organi e tessuti. Inoltre, la migrazione cellulare possiede un ruolo fondamentale nei processi di infiammazione e rigenerazione: i leucociti migrano verso le zone in cui si manifesta un’infezione, per esplicare le loro funzioni immunologiche; le cellule endoteliali, durante il processo di angiogenesi [Gobin and West, 2002], migrano nei tessuti circostanti per formare nuovi vasi sanguigni, mentre i fibroblasti e le cellule epiteliali si dirigono nelle aree cutanee danneggiate, per rigenerare i tessuti e riparare ferite della pelle [Friedl e Brocker, 2001]. Ancora, nelle metastasi, le cellule tumorali si staccano dalla iniziale massa tumorale migrando

verso l'ambiente circostante, al fine di espandersi il più possibile [Raeber et al., 2005; Friedl and Wolf, 2003].

La migrazione può dipendere dalla forza delle adesioni transitorie tra cellula e substrato. Se l'adesione alla superficie è debole, le interazioni non possono fornire la trazione: in tal caso non è possibile alcuna locomozione, e l'appiattimento cellulare è scarso. Se, invece, le cellule sono fortemente legate al substrato, risultano, senza dubbio, ben appiattite e immobilizzate, ma il processo dinamico e continuo di adesione e separazione, promotore della migrazione cellulare, è difficile e la locomozione comunque non avviene. Per una forza intermedia delle interazioni cellula-substrato, dovuta al legame simultaneo ma debole ad un gran numero di proteine della matrice, la translocazione del corpo cellulare è possibile [Di Milla et al., 1993]. Previsioni teoriche dettagliate sono state generate utilizzando un modello matematico basato proprio su tale concetto di dipendenza della velocità di migrazione dalla forza di adesione [DiMilla et al., 1992; DiMilla et al., 1991].

Le previsioni del modello sono state verificate in diversi studi sperimentali, a conferma che variazioni della concentrazione di proteine di adesione possono influenzare la motilità cellulare [Di Milla et al., 1993].

Gli ancoraggi intracellulari del citoscheletro, infatti, assicurano che non si verifichino strappi nel sito di connessione fra la cellula e la matrice extracellulare e permettono alla membrana cellulare di estendersi (spreading), formando delle protuberanze con strutture spesse e distese (lamellipodi) o cilindriche e sottili (filopodi), responsabili dell'orientazione e della morfologia della cellula durante la migrazione.

Queste considerazioni evidenziano che la rigenerazione tissutale in vitro implica l'esatta conoscenza delle funzioni cellulari, delle interazioni e dei segnali che le cellule devono ricevere dal materiale per simulare il comportamento del tessuto naturale.

La migrazione cellulare può essere considerata come un continuo movimento ciclico delle estensioni dei lamellipodi, presenti nella parte anteriore della cellula, seguito dalla traslocazione dell'intero corpo cellulare negli allungamenti di tali lamellipodi.

Le forze meccaniche che si generano all'interno della cellula, necessarie per attivare tale locomozione, riescono a sollecitare i filamenti di actina [Maheshwari e Lauffenburger, 1998], i quali formano un complesso reticolo con la rete citoplasmatica, presente sia nel citoscheletro che nella membrana nucleare. Questo stato di sollecitazione è quindi in grado di deformare la geometria del citoscheletro e, attraverso le connessioni con la membrana nucleare, di deformare anche il nucleo. La cellula reagisce, perciò, agli stress meccanici a cui è sottoposta con la totalità della sua struttura, facendo forza sui contatti focali, muovendosi e assumendo

una forma completamente appiattita sul substrato del materiale. In particolar modo, tale avanzamento cellulare è dovuto alla presenza simultanea di due tipi di forze differenti: la prima è una forza di trazione, che si genera nelle protuberanze dei lamellipodi per la presenza delle fibre di stiramento ossia delle fibre di actina polimerizzata, mentre la seconda è una forza di contrazione necessaria alla traslazione del corpo cellulare ed è dovuta allo spasmo che subisce il citoplasma [Raucher e Sheetz, 2001; Lauffenburger and Horwitz, 1996]. Tali forze non sono distribuite equamente, ma presentano un'asimmetria tra la parte anteriore e quella posteriore della cellula; si genera, così, una forza netta che fa muovere la cellula in avanti (figura 6).

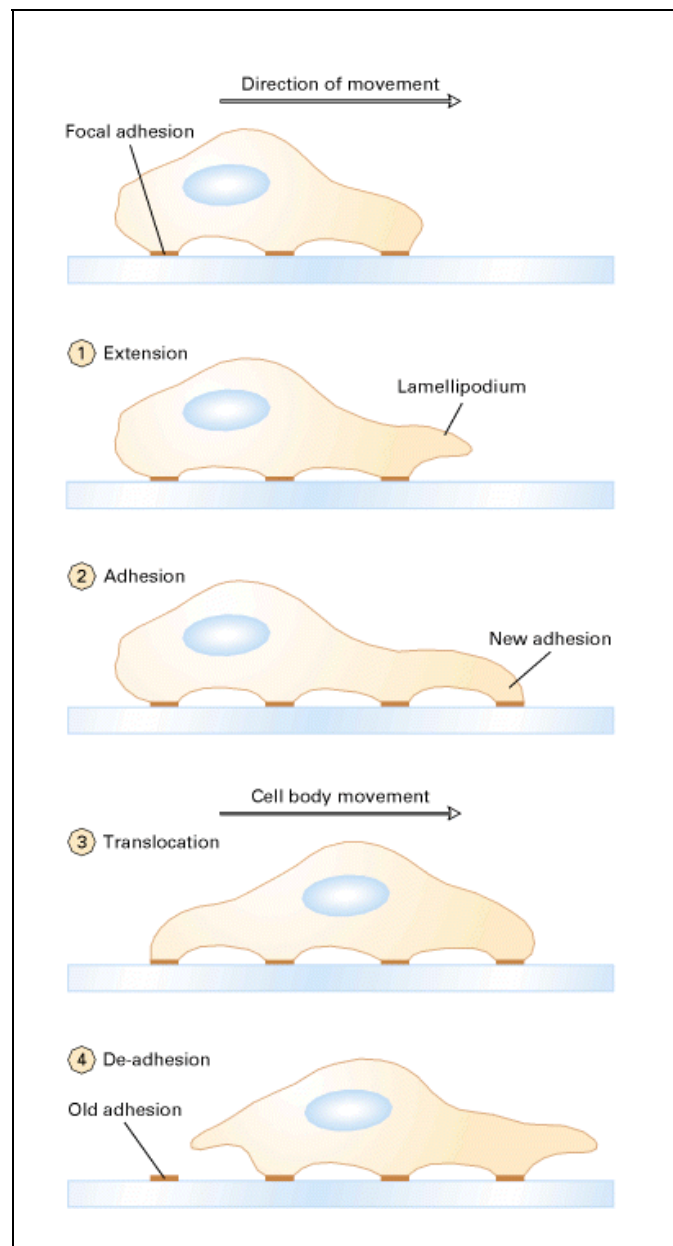


Figura 6: Fasi del processo di migrazione cellulare

Essa condiziona la direzione della migrazione cellulare nell'ambiente circostante ed è generata o da un gradiente di concentrazione dei ligandi circostanti, oppure da un gradiente dovuto all'esistenza di segnali biochimici solubili presenti nell'ECM, come i fattori di crescita [Maheshwari and Lauffenburger, 1998; Lauffenburger and Horwitz, 1996].

I meccanismi di migrazione cellulare, per tale motivo, si distinguono in chemotattici e in non chemotattici [Lauffenburger and Horwitz, 1996; Lauffenburger and Lindermann, 1992]. I meccanismi chemotattici sono direzionali e guidati da specifici segnali biochimici solubili: un esempio di chemotassia è quello che si attiva per le cellule endoteliali per la presenza di gradienti di ossigeno. I meccanismi non chemotattici sono invece fortemente influenzati dalla struttura e dalle proprietà meccaniche del materiale, e dalla presenza di siti di adesione; tale adesione è mediata da specifici recettori sulla membrana cellulare e da proteine di adesione presenti sul materiale.

A seconda del numero di ligandi presenti nella ECM e della loro distribuzione spaziale, la matrice può influenzare l'organizzazione del citoscheletro delle cellule; tale organizzazione, a sua volta, determina la velocità e la direzione migratoria cellulare. Allo stesso modo, però, anche le cellule riescono a rimodellare la forma della ECM circostante grazie allo stiramento che si verifica al loro interno ad opera delle fibre di actina.

5 Meccanismi di trasporto transmembrana

Tra le cellule e l'ambiente extracellulare esiste un continuo scambio di informazioni che vanno dall'esterno all'interno della cellula e viceversa, non solo mediante il riconoscimento di segnali da parte di recettori presenti sulla membrana plasmatica, ma anche attraverso il flusso di segnali che oltrepassano tale barriera.

5.1 La membrana cellulare

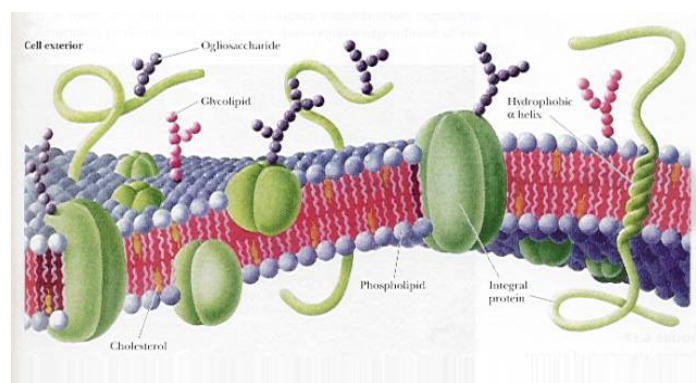


Figura 7: Modello della struttura della membrana cellulare.

La membrana cellulare separa la cellula dall'ambiente extracellulare ed al tempo stesso regola gli scambi con quest'ultimo. La struttura base della membrana cellulare è rappresentata dal doppio strato fosfolipidico (figura 7), ovvero un doppio strato di molecole fosfolipidiche disposte con le loro code idrofobe di acidi grassi rivolte verso l'interno e le loro teste idrofile, contenenti fosfato, verso l'esterno (figura 7). Inoltre è composta da proteine integrali di membrana, le quali, formano dei canali che regolano il passaggio di ioni, compiono il trasporto attivo, trasporto facilitato e fungono da recettori.

Le proteine periferiche ancorano il citoscheletro ed accelerano alcune reazioni chimiche. Infine, vi sono, i carboidrati di membrana che formano il glicocalice. I carboidrati lubrificano e proteggono la membrana cellulare e possono funzionare come recettori. Sono riconosciuti dal sistema immunitario come 'self'.

Le membrane cellulari si definiscono selettivamente permeabili. Ciò è molto importante al fine di mantenere le caratteristiche chimiche che individuano la cellula stessa e le condizioni metaboliche che sono necessarie al mantenimento della vita.

La distinzione fra cosa può attraversare la membrana e cosa non può avviene sulla base delle dimensioni, della carica elettrica, della struttura molecolare, della solubilità.

5.2 Meccanismi d'internalizzazione

I meccanismi che permettono il passaggio attraverso la membrana sono molto differenti.

I composti che non sono solubili nella membrana cellulare devono essere trasportati nella cellula da specifiche molecole trasportatrici, incorporate nella membrana. Un trasportatore può combinarsi soltanto con un composto o al massimo con una famiglia di composti simili fra loro. Questo tipo di diffusione mediata da un trasportatore viene chiamata anche trasporto passivo. Il trasporto passivo consente il passaggio di ioni e molecole senza spesa energetica.

Il processo di trasporto di sostanze attraverso membrane biologiche può richiedere una spesa energetica, come avviene nel caso del trasporto attivo, il quale richiede lo spostamento di sostanze sia contro un gradiente di concentrazione che contro il potenziale di membrana, creato dalla differenza di carica presente ai due lati della membrana, con l'interno negativo rispetto all'esterno. Uno dei sistemi proteici di trasporto attivo più comuni, che opera trasferendo gli ioni potassio (K^+) all'interno di una cellula con il simultaneo trasporto all'esterno di ioni sodio (Na^+), viene denominato "pompa ionica sodio-potassio" (figura 8). Infatti il mantenimento di una diversa e definita concentrazione di ioni all'interno e all'esterno

della cellula è di grande importanza fisiologica. L'energia richiesta è fornita dall'idrolisi di un composto chiamato ATP.

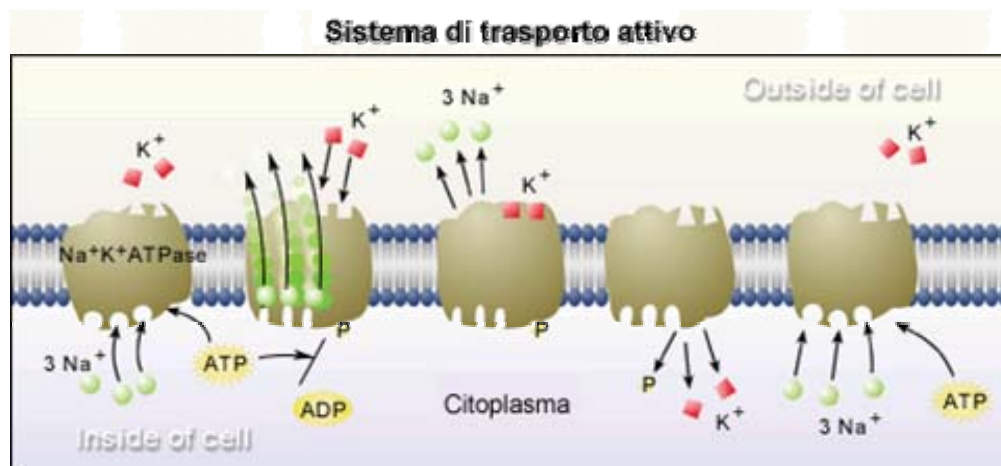


Figura 8: Pompa ionica sodio-potassio. Alla variazione della conformazione della proteina è associata l'uscita degli ioni sodio e l'entrata degli ioni potassio all'interno della cellula.

5.2.1 La diffusione

Possiamo distinguere la diffusione libera dalla diffusione mediata da un trasportatore.

La diffusione libera consiste nello spostamento delle particelle dalla zona a maggior concentrazione verso quella a minor concentrazione, si muovono secondo gradiente. Una sostanza che invece si sposta nella direzione opposta, verso una concentrazione maggiore delle proprie molecole, si muove contro gradiente. La diffusione avviene soltanto secondo gradiente. La velocità di trasporto delle molecole dall'esterno all'interno della cellula è direttamente proporzionale alla concentrazione esterna. Le membrane cellulari sono permeabili a sostanze quali l'acqua, l'ossigeno e l'anidride carbonica che le attraversano facilmente per diffusione.

Altre molecole usate o prodotte dalla cellula non possono diffondere attraverso la membrana cellulare a causa delle loro dimensioni o della loro polarità. Il trasporto di queste sostanze dipende dalle proteine integrali di membrana, che agiscono come vettori trasportando le molecole nelle due direzioni. Le proteine trasportatrici sono altamente selettive; una particolare proteina può legarsi a una certa molecola, mentre non può legarsi a una molecola quasi identica. Questo processo si chiama diffusione mediata da un trasportatore (figura 9). Se la concentrazione di un composto all'esterno di una cellula è maggiore che all'interno, il flusso risultante sarà diretto verso l'interno. Se la concentrazione del composto è maggiore all'interno della cellula, il flusso risultante sarà diretto verso l'esterno. Nel caso della diffusione mediata da un trasportatore, la molecola che deve essere trasportata deve

incontrarsi con il trasportatore. Avvenuto il contatto, il trasportatore impiega un tempo breve, ma finito, per depositare la molecola dall'altra parte della membrana. Durante questo breve intervallo di tempo, il trasportatore non può reagire con nessun'altra molecola. Il tempo medio che viene impiegato da un trasportatore per trasportare una molecola sarà la somma del tempo durante il quale attende che una molecola entri in collisione con esso e del tempo di transito attraverso la membrana in un senso e nel senso opposto. Perciò, la velocità di trasporto aumenta, ma solo fino ad un certo punto.

La più caratteristica differenza fra i due sistemi di trasporto è che i sistemi che funzionano grazie alla diffusione mediata da un trasportatore sono saturabili, mentre quelli che funzionano grazie alla diffusione libera non sono tali.

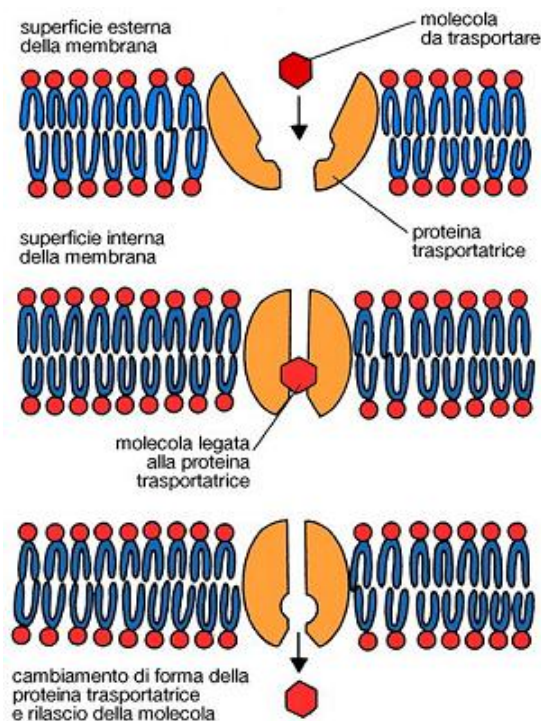


Figura 9: Nelle cellule sono presenti molte proteine vettrici, o trasportatrici, che hanno la funzione di consentire il passaggio di determinate sostanze attraverso la membrana cellulare.

5.2.2 L'osmosi

Un altro fenomeno fisico da prendere in esame per capire i problemi del trasporto attraverso la membrana della cellula è quello dell'osmosi. L'osmosi è un tipo particolare di diffusione, che avviene quando due soluzioni acquose, contenenti quantità diverse di una sostanza disciolta (per esempio, sale in acqua), sono separate da una membrana semipermeabile, che permette cioè il passaggio del solvente (acqua) ma non quello della sostanza disciolta (nell'esempio, sale). L'acqua comincia a passare dalla soluzione più diluita verso quella più concentrata, fino a che ambedue non raggiungono la stessa concentrazione. La diffusione non è influenzata dal

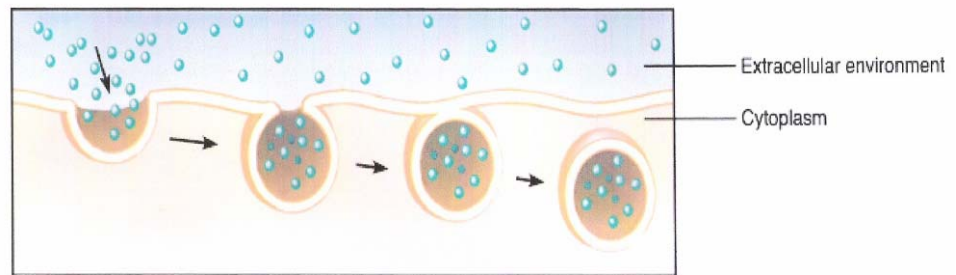
tipo di sostanza disciolta, ma dalla sua quantità, cioè dalla sua concentrazione. Quando si è raggiunto un equilibrio fra le due concentrazioni, le soluzioni si dicono isotoniche. Anche le pareti cellulari si comportano, entro certi limiti, come delle membrane semipermeabili. Quindi, se una cellula si trova a contatto con una soluzione salina più concentrata dei suoi liquidi interni, l'acqua passerà dalla cellula verso l'esterno e questa tenderà a rimpicciolirsi, a raggrinzirsi. Se, invece, una cellula viene a contatto con una soluzione meno concentrata dei suoi liquidi interni, l'acqua passerà dall'esterno all'interno della cellula e questa tenderà a rigonfiarsi, in qualche caso fino a scoppiare. Per evitare queste conseguenze, la cellula ha la necessità di trovarsi in condizioni isotoniche rispetto all'ambiente che la circonda. Dovrà quindi in qualche modo regolare la concentrazione delle sostanze disciolte ai due lati della membrana.

5.2.3 Trasporto mediato da vescicole

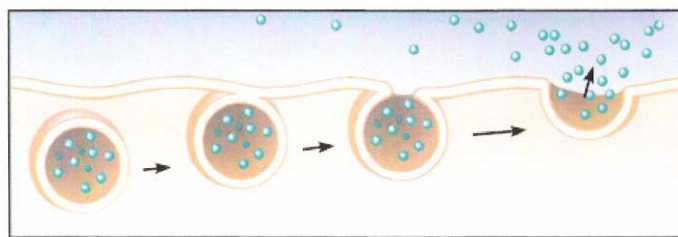
Oltre alla pompa $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ esistono altri sistemi di trasporto attivo sulla membrana citoplasmatica, che permettono il passaggio all'interno della cellula di zuccheri, aminoacidi, purine, pirimidine, vitamine ed altre molecole organiche e ioni inorganici.

Le cellule possono comunque trasportare al proprio interno le sostanze necessarie al metabolismo anche grazie ad un meccanismo del tutto differente dal trasporto attivo mediato da pompe di membrana: tale meccanismo prende il nome di endocitosi (figura 10 a), dal greco endo = dentro e kytos = cavità. Sono conosciuti due tipi di endocitosi, che prendono il nome rispettivamente di pinocitosi e fagocitosi. Se il materiale assorbito è solido il meccanismo è definito fagocitosi, se il materiale è liquido il meccanismo è definito pinocitosi (figura 11).

Il trasporto mediato da vescicole può avvenire anche in senso opposto. Molte sostanze vengono esportate dalla cellula all'interno di vescicole prodotte dagli apparati di Golgi; le vescicole si spostano da questi verso la superficie della cellula, si fondono con la membrana cellulare ed espellono il loro contenuto. Questo processo è noto come esocitosi (figura 10 b).



(a) Endocytosis



(b) Exocytosis

Figura 10: Fasi dei processi di endocitosi (a) e esocitosi (b).

5.2.3.1 La fagocitosi

La fagocitosi è l'insieme dei fenomeni che portano alla cattura e alla demolizione di particelle solide. Nella fagocitosi il contatto fra la membrana cellulare e la sostanza solida provoca un'estensione della membrana cellulare intorno alla particella che viene racchiusa in un vacuolo. Uno o più lisosomi si fondono successivamente col vacuolo, immettendo al suo interno enzimi idrolitici. Gli enzimi idrolitici sono capaci di digerire le molecole introdotte e danno origine ai liposomi secondari, nei quali avviene la digestione. Le piccole molecole, prodotte dalla demolizione di molecole più grosse, possono passare nel citosol attraversando la membrana dei liposomi e quindi essere utilizzate nuovamente per produrre energia.

Le vescicole risultano essere altamente specializzate. Riescono, infatti a inglobare uno o più tipi di molecole mediante i recettori presenti sulla membrana e soprattutto riescono ad indirizzarsi all'interno del citoplasma verso quei liposomi che contengono enzimi giusti per degradare specifiche molecole e non altre. Sembra che il responsabile del corretto orientarsi delle vescicole sia una serie di proteine che rivestono la membrana esterna delle vescicole stesse, dette appunto vescicole rivestite: le proteine servirebbero, prima, ad ancorare un solo tipo di recettore e, poi, a guidare la vescicola verso il lisosoma che è in grado di riconoscere questo rivestimento.

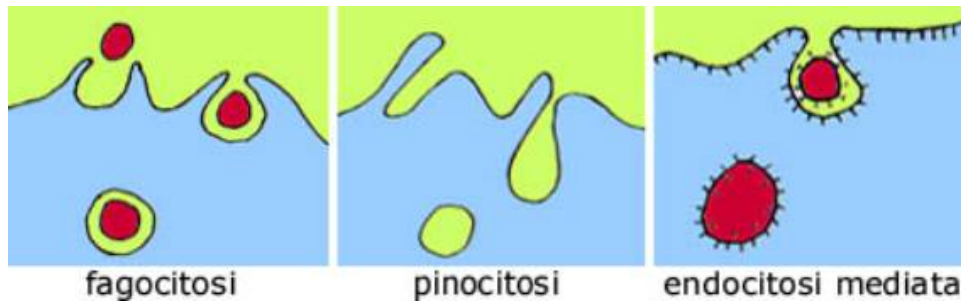


Figura 11: Meccanismi di internalizzazione cellulare.

5.2.3.2 La pinocitosi

Le cellule inglobano anche materiale liquido proveniente dal loro ambiente extracellulare. La pinocitosi, quindi, consiste nell'assunzione non specifica di piccoli quantitativi di fluido extracellulare, nel quale sono contenuti i materiali più disparati, comprese le macromolecole di interesse metabolico. Richiede modificazioni della membrana meno estese di quelle necessarie per la fagocitosi. Si formano delle introflessioni che risucchiano gocce di liquido, le quali entrano nel citoplasma avvolte da membrane a costituire le vescicole pinocitotiche.

La pinocitosi non ha, comunque, lo scopo di fare entrare acqua nella cellula, bensì quello di incamerare in un veicolo fluido materiali il cui ingresso non può avvenire in altro modo.

5.2.3.3 Endocitosi mediata da recettori

È un processo altamente specifico in quanto recettori disposti sulla membrana selezionano le macromolecole del fluido extracellulare e guidano il loro ingresso nella cellula anche quando esse si trovano a concentrazioni minime, oppure si trovano mescolate con altre molecole.

I recettori sono localizzati in particolari zone dentellate della membrana, note come fossette, oppure migrano in tali zone dopo essersi legati alla molecola da trasportare. L'invaginazione di queste regioni procede rapidamente fino a quando non si formano le vescicole. Uno o più lisosomi si fondono con la vescicola liberando nel citosol il suo contenuto.

-CAPITOLO 3-
INTERAZIONE CELLULA-MATRICE IN VITRO
RUOLO DEI BIOMATERIALI NEL CONTROLLO
DELLE FUNZIONI CELLULARI

1 Interazione cellula-matrice in vitro

Da quanto esposto nel precedente capitolo, risulta evidente l'importanza che riveste l'interazione cellula-matrice nella regolazione di tutte le funzioni cellulari. E' per tale motivo che la scienza dei biomateriali sta cercando di ingegnerizzare opportunamente i materiali in modo da rispondere alle esigenze più comuni delle applicazioni biomediche. Oggigiorno, numerosi sono gli approcci utilizzati per la progettazione di biomateriali sempre più innovativi. Fino a poco tempo fa le uniche due caratteristiche che un biomateriale doveva possedere erano la biocompatibilità (il materiale non deve essere né citotossico né immunogeno) e la biodegradabilità (il materiale deve essere facilmente eliminabile, una volta svolta la sua funzione). Nell'accezione moderna di biomateriale, però, tra le sue caratteristiche, si deve aggiungere anche la capacità del biomateriale di interfacciarsi con l'ambiente biologico e di modulare in modo "specifico" la risposta cellulare. Il biomateriale diventa, quindi, non solo un supporto per la rigenerazione di un tessuto o un veicolo per il trasporto di un farmaco, ma parte attiva nella regolazione delle funzioni cellulari. Nella progettazione di un biomateriale, perciò, bisogna tener conto dei diversi parametri che possono influenzare l'interazione cellula-materiale. Tali parametri rappresentano le caratteristiche del materiale, che possono essere chimiche, quali la natura del materiale e la presenza di segnali biochimici, e fisiche, quali le proprietà meccaniche del materiale, la forma e le dimensioni.

2 Modulazione delle caratteristiche chimiche del materiale

2.1 Natura del materiale

I materiali utilizzati per applicazioni biomediche possono essere suddivisi in due classi principali: naturali e sintetici. I primi sono generalmente di natura proteica (come, ad esempio, il collagene o la fibrina) o polisaccaridica (come ad esempio l'acido ialuronico). Il vantaggio principale nell'utilizzo di materiali naturali sta nella loro natura amminoacidica o polisaccaridica che ne facilita il riconoscimento da parte delle cellule, poiché posseggono intrinsecamente i segnali biochimici per l'attivazione di determinate risposte cellulari. D'altro canto, però, questi materiali di origine naturale presentano alcuni inconvenienti, quali la composizione spesso variabile, la scarsa prestazione meccanica, il limitato tempo di permanenza (veloce degradazione o assorbimento) e, soprattutto nel caso di materiali di derivazione animale, problemi relativi all'immunogenicità.

I materiali sintetici (ad es. l'acido polilattico o il poli-etilenglicole), invece, hanno dalla loro i bassi costi di produzione, l'ottima riproducibilità e alte prestazioni meccaniche. Il maggiore

svantaggio è che tali materiali non vengono riconosciuti dalle cellule in maniera specifica e, quindi, non sono in grado di guidare l'interazione cellula-materiale.

2.2 Bioattivazione

Sia i materiali naturali che quelli sintetici non permettono un'efficace regolazione dell'interazione cellula-materiale. Per tale motivo, oggi si tende a modificare questi materiali al fine di ricreare un microambiente finemente strutturato con cui le cellule possano interagire "attivamente". In particolare, si è reso necessario sviluppare adeguate tecnologie per far sì che la matrice possa esprimere segnali biologici in modo determinato e controllato. Perché ciò si verifichi, polimeri ultrapuri e biodegradabili devono essere opportunamente organizzati e "bioattivati", in modo da fungere da substrati permissivi per la crescita e l'impianto di cellule. La bioattività può essere indotta o da trattamenti superficiali, o a seguito dell'introduzione nel materiale di molecole biologicamente attive (inclusi fattori di crescita, inibitori di crescita, fattori angiogenici e/o agenti immunosoppressori), al fine di indurre nella popolazione di cellule coinvolta un programma specifico. Un materiale per applicazioni nell'ingegneria dei tessuti può essere bioattivato al fine di favorire l'adesione o la migrazione cellulare, oppure nel drug delivery o nella gene therapy, la bioattivazione può servire per favorire o inibire specificamente il processo endocitico.

Un modo per inserire segnali biologici sul materiale è l'*adsorbimento proteico* [Keselowsky, 2004]. Le cellule messe a contatto con la superficie di un biomateriale devono prima di tutto aderire e la qualità dell'adesione, da cui dipenderà la successiva capacità di proliferare, migrare e differenziare, dipende dalle proteine adesive adsorbite al materiale.

La prima cosa che si verifica quando un materiale sintetico è messo a contatto con un fluido biologico (come sangue, plasma o un qualsiasi mezzo per coltura cellulare) contenente proteine disciolte di diverso tipo, è l'adsorbimento proteico sulla superficie del polimero. L'adesione cellulare e la riorganizzazione in tessuti sono processi successivi e dipendono dalla natura e qualità dello strato proteico che si è adsorbito. Il processo di adsorbimento proteico (di proteine della ECM) in appropriata quantità, spettro, conformazione spaziale, flessibilità e accessibilità alle integrine è fortemente influenzato dalle proprietà fisiche e chimiche del materiale (bagnabilità, carica elettrica, ruvidezza, topografia, proprietà meccaniche, quali rigidità o flessibilità, cristallinità, porosità, solubilità e pH), dalla natura della proteina e dalla soluzione in cui la proteina è disciolta. Questi fattori determinano il modo in cui molecole biologiche sono adsorbite al materiale e, in particolare, determinano l'orientamento delle molecole adsorbite e, di conseguenza, anche il comportamento delle

cellule in contatto con esso. La diversità della risposta cellulare a materiali differenti dimostra che le cellule hanno la capacità di discriminare la diversa chimica del materiale. Il ruolo che i diversi componenti della ECM hanno sul comportamento cellulare può essere facilmente osservato piastrando un certo tipo cellulare su substrati inerti di vetro o polistirene pretrattati con proteine dell'ECM. Ad esempio, le HUVECs che sono cellule endoteliali umane estratte da cordone ombelicale, si comportano in maniera diversa a seconda della composizione del substrato. Esse reticolano e tubulizzano quando piastrate su coat di Matrigel (una miscela eterogenea di ECM), diversamente formano una rete cellulare con maglie più o meno estese se piastrate in collagene o collagene-fibronectina, per formare un monostrato confluyente di cellule quando il coat è costituito da collagene e acido ialuronico.

Diversi sono i limiti dei substrati pretrattati con proteine (“protein coated substrates”):

- 1) non è possibile conoscere la densità dei ligandi effettivamente disponibili ai recettori cellulari; pur conoscendo la densità della proteina fatta adsorbire al substrato, la configurazione spaziale e l'orientamento assunto dalle proteine adsorbite potrebbe mascherare i ligandi interessati al legame; la distribuzione dei ligandi è per lo più eterogenea (figura 1).
- 2) le proteine adsorbite vanno incontro a denaturazione e il grado di denaturazione e quindi di attività proteica è difficilmente prevedibile, in quanto dipende da numerose variabili, tra le altre la struttura della proteina, la natura del substrato, il pH e la temperatura.
- 3) le proteine del rivestimento (“coat”) possono modificare la propria attività sia interagendo con altre proteine contenute nel mezzo di coltura sia in seguito ad attività enzimatica e biosintetica operata dalle cellule con cui entrano in contatto.
- 4) non è da escludere, inoltre, che l'adsorbimento proteico può essere reversibile: la proteina, una volta adesa, può staccarsi dal substrato o essere spiazzata da altre proteine presenti in soluzione (effetto Vroman), o ancora andare incontro a cambiamenti conformazionali.



Figura 1. Substrato sintetico viene condizionato con mezzo di coltura per indurre adsorbimento proteico. Le proteine che si depositano sulla superficie del materiale assumono diverse conformazioni e sono diversamente orientate. Non tutti i ligandi (zone scure) sono effettivamente disponibili ai recettori cellulari.

In aggiunta a questi limiti, si è scoperto che i recettori cellulari riconoscono, come ligando, un dominio molto ristretto dell'intera proteina, rappresentato da una breve sequenza amminoacidica. Per cui, oggi, la bioattivazione dei materiali viene fatta utilizzando "frammenti" di molecole (peptidi), e non proteine intere, legati in modo covalente al materiale (tabella 1).

Peptide sequence	Derived from	Conjugate receptor	Role	References
IKVAV	Laminin α -chain	LBP110 (110 KDa laminin binding protein)	Cell-ECM adhesion	J. Biol. Chem. 264, 16174 (1989)
RGD	Laminin α -chain, fibronectin, collagen	Multiple integrins	Cell-ECM adhesion	J. Cell Physiol. 146, 451 (1991)
YIGSR	Laminin β 1-chain	$\alpha_1\beta_1$ and $\alpha_3\beta_1$ integrins	Cell-ECM adhesion	Cell 48,989 (1987); Arch. Biochem. Biophys. 272, 39 (1989); J. Biol. Chem. 268, 8053 (1993)
RNIAEIIKDI	Laminin γ -chain	unknown	Cell-ECM adhesion	FEBS Lett. 244, 141 (1989)
HAV	N-cadherin	N-cadherin	Cell-cell adhesion	Dev. Biol. 139, 227(1990)
DGEA	Type I collagen	$\alpha_2\beta_1$ integrin	Cell-ECM adhesion	
VAPG	Elastase	Elastase receptor	Cell-ECM adhesion	
KQAGDV	Fibrinogen γ -chain	β_3 integrins	Cell-ECM adhesion	

Tabella 1. Esempio di peptidi utilizzati per modulare l'adesione cellulare sui biomateriali.

La sequenza peptidica maggiormente utilizzata, grazie alla sua ampia distribuzione nell'organismo e all'abilità che possiede di indirizzare più recettori di adesione, è forse l'RGD (tripletta costituita da appena tre amminoacidi Arginina-Glicina-Aspartato): essa rappresenta il sito con cui la fibronectina si lega ai recettori cellulari promuovendo l'adesione.

La prima metodica utilizzata per legare covalentemente i peptidi ai materiali è stata la *sintesi chimica di peptidi su substrato solido* [Massia, 1990; Massia, 1993]. Recentemente è stato dimostrato che l'aggiunta di uno spaziatore tra il substrato e il peptide favorisce il riconoscimento biologico da parte della cellula e promuove l'adesione cellulare. La chimica dei *Self Assembled Monolayers (SAMs)* [Mrksich, 1996; Mrksich, 1997; Mrksich, 2000] ha permesso, in tal senso, di migliorare l'esposizione del segnale. I SAMs sono monostrati costituiti preferenzialmente da alcantioli, cioè lunghe catene carboniose che terminano ad un'estremità con un tiolo (-SH) ed, all'altra, con un qualsiasi gruppo funzionale (-CH₃, -OH, -COOH, ecc.). La particolarità dei SAMs sta nella capacità di interagire con superfici ricoperte da metalli, quali l'oro o l'argento, tramite il tiolo e disporsi in maniera ordinata, con un'inclinazione specifica, su tali superfici formando dei monostrati ordinati (figura 2).

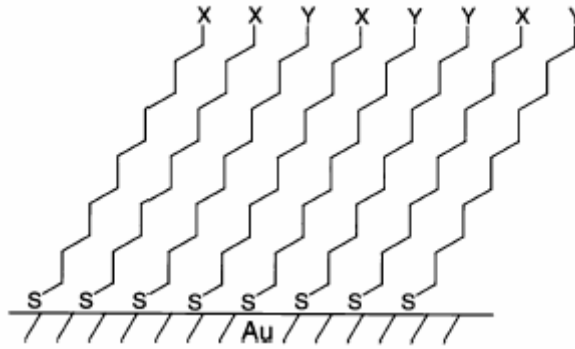


Figura 2. Self Assembled Monolayers (SAMs)

Inoltre queste molecole possono essere facilmente modificate chimicamente all'estremità libera e, facendo variare il numero dei carboni, modulare anche l'estensione della catena (figura 3).

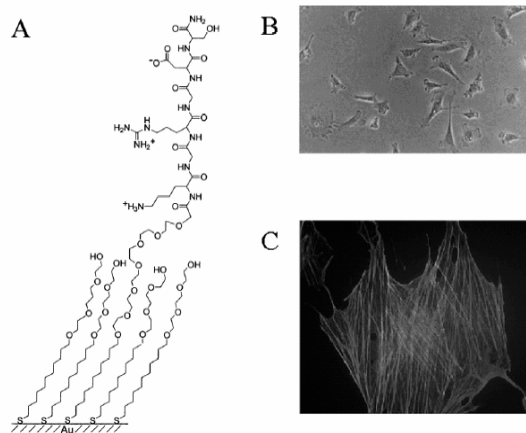


Figura 3. A. Struttura di un monostrato che presenta il peptide Gly-Arg-Gly-Asp-Ser legato a gruppi di tri(etilen glicole). B. Immagine ottica di fibroblasti adesi al monostrato. C. Filamenti di actina del citoscheletro.

Anche la *distribuzione spaziale* e la *densità* dei segnali sul substrato è di fondamentale importanza nella modulazione della risposta cellulare. E' stato dimostrato, ad esempio, che a parità di numero di segnali biologici, le cellule migrano in modo diverso a seconda della distribuzione (omogenea o clusterizzata) di tali segnali [Maheshwari et al., 2000]. Inoltre "patternando" substrati in regioni che alternativamente favoriscono o prevengono l'adsorbimento proteico, i processi di adesione e "spreading" cellulare possono essere controllati nello spazio. Diverse sono le strategie adottate per tale scopo. Tra le strategie più comunemente adottate citiamo il *microcontact printing* (μ CP) e la *fotolitografia*. Il μ CP usa un stampo elastomerico di polidimetilsilossano (PDMS) per stampare un pattern di alcanotiolati su un film di oro [Mrksich, 1996; Mrksich, 1997; Mrksich, 2000]. La fotolitografia, invece, è un processo che permette la formazione di monostrati patternati adoperando la radiazione ultravioletta come mezzo di esposizione. Il processo permette il

trasferimento del pattern, che si desidera riprodurre, da una maschera ad un sottile strato di materiale sensibile alle radiazioni (chiamato “resist”) che copre la superficie di un substrato [Besson et al., 2002].

In vivo i processi di migrazione e differenziamento embrionale dipendono da gradienti di segnali biochimici. Anche in vitro si è cercato di modulare la risposta cellulare realizzando materiali in cui i segnali fossero distribuiti in maniera direzionata. Sono stati creati, in tal senso, gradienti sia di fattori solubili che di fattori legati covalentemente ad un substrato e si osservato che le cellule si orientano secondo la direzione del gradiente [DeLong et al., 2005].

3 Modulazione delle caratteristiche fisiche del materiale

3.1 Importanza delle proprietà meccaniche nella progettazione di biomateriali

Le più moderne strategie per lo sviluppo di tessuti ingegnerizzati prevedono l’interazione tra cellule e scaffolds di natura sintetica. La matrice sintetica fornisce la struttura iniziale sulla quale le cellule possono, eventualmente, organizzarsi e formare un nuovo tessuto.

Sebbene nello sviluppo di nuovi materiali gli sforzi si siano concentrati finora soprattutto sulle proprietà chimiche, di recente si è osservato che le cellule sono molto sensibili anche alle proprietà meccaniche del substrato. I tessuti del corpo umano, infatti, possiedono rigidità molto variabili: se quantificate in termini di modulo di Young, si può passare dai 18 kPa del tessuto osseo, ai 2.5 kPa del tessuto cerebrale. Quando, poi, insorgono malattie, le caratteristiche fisiche dei tessuti e della matrice extracellulare possono risultare alterate: i tumori, ad esempio, presentano una rigidità molto più elevata rispetto agli omologhi tessuti sani [Liu and Chen, 2005]. Non solo, è stato dimostrato come stimoli meccanici, generati dal cambiamento conformazionali del citoscheletro delle stesse cellule (*tensegrity*) possono influenzare anche la morfogenesi tessutale durante lo sviluppo embrionale [Ingber, 2006].

Tutte queste osservazioni hanno lasciato supporre che il comportamento cellulare fosse sensibile alle caratteristiche meccaniche del substrato (*mechanosensory*) [Discher et al., 2005].

Inizialmente, nello studio di tali caratteristiche, si è fatto ricorso a polimeri di origine naturale, le cui proprietà meccaniche potevano essere modificate cambiandone la concentrazione (visto che, ad esempio, l’elasticità di biopolimeri semiflessibili, formanti network viscoelastici, è proporzionale alla loro concentrazione al quadrato). In questo modo, però, non si riusciva a capire se il differente comportamento cellulare fosse realmente da ascrivere alla variazione di

rigidezza della matrice o, piuttosto, a cambiamenti di natura chimica (ad esempio, nella concentrazione di ligandi).

Al fine di isolare gli effetti delle proprietà meccaniche, si è reso, allora, necessario l'utilizzo di materiali di natura sintetica nella realizzazione delle matrici: polimeri come la poli-acrilammide (PAAM) o il PEG (che sono antiadesivi per le cellule, ma in grado di essere bioattivati) possono dar luogo a substrati a diversa rigidezza semplicemente variando la concentrazione [Lo et al., 2000], o la densità dei crosslinkers [Zaari et al., 2004].

Diversi studi hanno individuato come ottimali per la migrazione valori di rigidezza abbastanza elevati (15÷20 kPa) [Lo et al., 2000], mentre per l'adesione sembra siano necessari substrati ancora più rigidi ($E > 30$ kPa) [Zaari et al., 2004]. Tuttavia, restano da chiarire molti aspetti del fenomeno: è probabile, ad esempio, che determinati valori di rigidezza siano adatti per una linea cellulare, ma non per un'altra, o che lo stesso valore del modulo di Young possa risultare idoneo per un polimero, ma non per un altro.

Riguardo all'influenza della flessibilità della matrice su adesione e migrazione, poi, le notizie di cui si dispone sono ancora più limitate, dato che solo recentemente si è riuscito a produrre substrati in cui la flessibilità potesse essere correttamente controllata [Mrksich, 2000; Mrksich et al., 1997; Mrksich et al., 1996].

3.2 Forma del materiale

La topografia della matrice extracellulare può influenzare significativamente il comportamento delle cellule. In più occasioni è stato documentato come la struttura topografica del substrato sortisca effetti diretti ed evidenti sulla capacità che hanno alcuni elementi cellulari di orientarsi, di migrare e di riorganizzare il citoscheletro. Le membrane basali sono forse l'esempio di substrato di origine naturale più diffuso in ambito biologico [Flemming et al., 1999]. Considerato che le membrane basali possiedono una complessa *topografia* tridimensionale derivante dalla presenza di pori, fibre, canali e altri elementi superficiali di dimensioni nanometriche, è ragionevole ipotizzare che anche la struttura della loro superficie contribuisca in qualche modo alla determinazione di comportamenti cellulari specifici e affatto casuali [Flemming et al., 1999]. Similmente a quanto accade per substrati di origine naturale, anche superfici di materiale sintetico dalla composizione chimica nota e dalle caratteristiche superficiali controllate possono influenzare il comportamento cellulare. Le tecniche di fabbricazione che consentono di produrre substrati sintetici aventi una topografia superficiale controllata sono numerose e alquanto variegata (fotolitografia, polimerizzazione all'interno di una preforma che faccia da stampo, deposizione fisica o chimica da fase di

vapore, ecc.) [Brunette et al., 1983; Mrksich et al., 1996; Winkelmann et al., 2003; Scotchford et al., 2003]. Gli *elementi topografici* riproducibili sulla superficie di un materiale possono avere la *forma* e le *dimensioni* più disparate (compatibilmente con il materiale stesso e con la tecnica di fabbricazione adottata); la *struttura topografica* prodotta dalla presenza di una o più tipologie di elementi topografici, *distribuiti* sulla superficie con una certa *densità*, può essere dotata o meno di proprietà quali la *simmetria* e/o la *regolarità*. La tipologia di elementi topografici maggiormente impiegata per esperimenti con le cellule viventi è quella dei *canali* [Ohara et al., 1979]. In alcuni casi le superfici sono state strutturate mediante *fori* [Curtis et al., 2001], *pozzi e nodi* [Schmidt et al., 1991], *sferule* [Fujimoto et al., 1997], *pillars* [Curtis et al., 2001], *rilievi* [Cooper et al., 1976], *gradini* [Curtis et al., 2001]; in effetti, qualsiasi tipo di depressione o rilievo superficiale (persino la *porosità* e la *rugosità*) contribuiscono a determinare la struttura topografica di una superficie.

In generale, la sperimentazione condotta con superfici su cui siano stati prodotti dei canali ha rivelato che molti tipi cellulari tendono ad allinearsi all'asse principale dei canali stessi [Ohara et al., 1979] e che spesso anche l'organizzazione dei componenti citoscheletrici e dei contatti focali risulta orientata nella medesima direzione [Oakley et al., 1993]. Il grado di allineamento cellulare nella direzione individuata dai canali dipende in modo complesso dalle caratteristiche proprie della struttura topografica.

Da un'analisi accurata dei meccanismi e della dinamica di risposta agli stimoli topografici da parte delle cellule è possibile distinguere il fenomeno della *topographic guidance* (o *contact guidance*) [Weiss, 1958], attribuibile alla reazione immediata da parte dei microtubuli, da quello della *topographic compensation*, di cui invece sono responsabili i microfilamenti [Oakley et al., 1997]. Ovviamente la presenza dei canali può indurre, nei tipi cellulari sensibili agli stimoli topografici, anche un orientamento preferenziale della migrazione [Wilkinson et al., 1982]. In presenza di canali di opportune dimensioni, invece, la cellula aderisce al substrato cambiando sensibilmente la struttura del proprio citoscheletro: il risultato è che i fasci di microfilamenti si dispongono prevalentemente nella stessa direzione dei canali (figura 4 b).

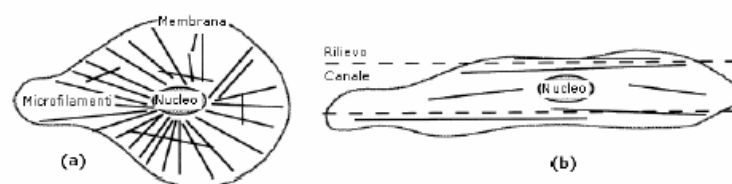


Figura 4. Rappresentazione schematica del citoscheletro di una cellula: (a) cellula adesa ad una superficie piatta, (b) riorganizzazione dei microfilamenti in una cellula adesa ad una superficie con canali e rilievi (le linee tratteggiate individuano la discontinuità dovuta alle pareti del canale).

Infine, è stato osservato che anche la simmetria e la regolarità della struttura topografica, a parità di altre sue caratteristiche morfologiche e dimensionali, sono proprietà importanti per le cellule [Curtis et al., 2001].

3.3 Dimensione del materiale: le nanoparticelle

3.3.1 Definizione

Con il termine nanoparticelle si identificano cluster atomici, le cui dimensioni vanno da 1 nm a qualche centinaio di nanometri. Le nanoparticelle esibiscono delle caratteristiche fortemente dipendenti dalle dimensioni rispetto a particelle di dimensioni maggiori. Le loro proprietà superficiali sono maggiormente rilevanti rispetto alle proprietà di volume [Berry e Curtis, 2003].

Le ridotte dimensioni delle nanoparticelle fanno in modo che possano essere confrontate con le entità biologiche. Infatti, un virus ha dimensioni tra i 20 e i 450 nm, una proteina tra i 5 e i 50 nm, mentre un gene arriva ad avere una lunghezza tra i 10 e i 100 nm ed uno spessore di circa 2 nm [Pankhurst ed altri, 2003].

Oggigiorno le nanotecnologie si sono sviluppate ad un livello che rende possibile produrre, definire e, in modo particolare, confezionare le proprietà funzionali delle nanoparticelle ad hoc per applicazioni cliniche e diagnostiche [Hofmann ed altri, 2001].

3.3.2 Applicazioni delle nanoparticelle in diagnostica e terapia

Le nanoparticelle possono avere applicazioni sia nel campo diagnostico che terapeutico. Nel campo diagnostico vengono, ad esempio, usate nel far progredire le tecniche di bioimmagini, per esempio sfruttando nanoparticelle di ferro per migliorare la qualità di indagini come la risonanza magnetica. Per quanto riguarda il campo terapeutico possono essere usate, ad esempio, per supportare il drug delivery, cioè lo sviluppo di sistemi alternativi di indirizzamento dei farmaci nell'organismo, con l'obiettivo di circoscriverne l'effetto biologico su un determinato tipo di cellule, migliorando l'efficacia e riducendo la tossicità. In realtà, il rischio di danneggiare i tessuti sani non può essere escluso nemmeno con le nanoparticelle, ma una terapia più selettiva, quale può essere definita quella che fa uso di nanoparticelle, dovrebbe ridurre questa eventualità. Un'altra possibilità di utilizzo delle nanoparticelle è quella di veicolare nelle cellule frammenti di DNA terapeutici attraverso nanodispositivi, una sorta di nanoterapia genica; finora per ovviare alla difficoltà di indirizzare il materiale genetico su cellule specifiche si è fatto ricorso ai virus, che però sono altamente immunogeni.

L'uso di nanoparticelle con un'elevata area superficiale, invece, può veicolare un'alta quantità di materiale genetico nelle cellule malate, senza il rischio di reazioni anticorpali. Per quello che riguarda la cura dei tumori, due sono i campi d'esplorazione per il possibile utilizzo di nanoparticelle: uno diagnostico e uno più specificamente terapeutico. Che significa, a livello terapeutico, un'efficacia infinitamente maggiore e, a livello diagnostico, tempestività nell'identificazione della malattia. Precocità della diagnosi significa, spesso, guarigione sicura, almeno per alcuni tumori.

3.3.2.1 Risonanza magnetica

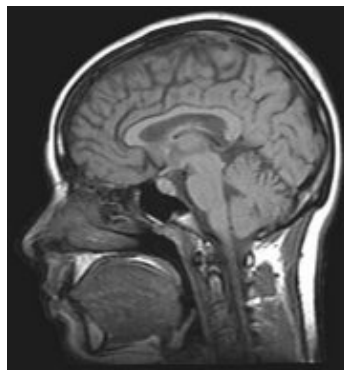


FIGURA 5. Risonanza magnetica nucleare di un cranio umano.

La risonanza magnetica costituisce il più recente tipo di imaging diagnostico, capace di sommare le caratteristiche informative delle precedenti metodiche, poiché è in grado di analizzare la totalità dei distretti corporei come la tomografia assiale computerizzata (T.A.C.); di garantire l'approccio multiplanare come gli ultrasuoni; di obiettivare l'attività dinamica parietale cardio-vascolare, come gli ultrasuoni e la medicina nucleare; di analizzare le caratteristiche isto-metaboliche, come la medicina nucleare (figura 5).

I "protagonisti" dell'immagine R.M. sono tre: le caratteristiche magnetiche intrinseche proprie delle strutture corporee; le "sollecitazioni" che dall'esterno vengono apportate su tale substrato magnetico corporeo; infine le complesse interazioni che ne conseguono. Nell'ambito degli atomi che intervengono nella costituzione del corpo umano, alcuni presentano la peculiarità che il loro nucleo è animato da movimento di rotazione su se stesso (spin). Stante che il movimento di cariche elettriche genera un campo magnetico, ciascuno dei nuclei dotati di spin concretizza un proprio campo magnetico intrinseco, il cui orientamento nello spazio è del tutto casuale [Pistolesi ed altri, XXXVIII].

La risonanza magnetica nucleare, quindi, è un fenomeno esibito da tutti quei nuclei atomici che hanno la caratteristica di allinearsi lungo la direzione del campo, di assorbire energia

elettromagnetica fornita da una determinata frequenza, definita, appunto, di risonanza, e di cedere successivamente questa energia per tornare alla posizione di equilibrio indotta dal campo magnetico esterno.

La proprietà fisica responsabile di questo comportamento dei nuclei è definita momento magnetico nucleare, rappresentato dal vettore risultante dalla somma dei singoli momenti presenti in un nucleo atomico. Bisogna ricordare che solo gli atomi con numero dispari di protoni avranno un momento magnetico, poiché negli atomi con numero di protoni pari all'interno del nucleo, i momenti magnetici dei singoli protoni tendono ad annullarsi reciprocamente fornendo un vettore momento magnetico risultante nullo.

Tra i nuclei con numero dispari di protoni, l'idrogeno è quello più abbondante nell'organismo umano. Il protone può essere assimilato ad un dipolo magnetico. In condizioni naturali, i vari dipoli presenti nel corpo umano sono orientati casualmente, così che qualunque organismo vivente non possiede una magnetizzazione macroscopica. Quando però tale organismo viene immerso in un campo magnetico statico esterno, i vari dipoli tenderanno ad orientarsi lungo la direzione del campo magnetico. Rispetto ad un campo magnetico, i protoni, allineati lungo le linee di forza, potranno orientarsi secondo due direzioni, parallela o antiparallela, tra queste due la prima condizione è quella favorita perché il sistema avrà bisogno di meno energia.

Ma oltre ad allinearsi lungo la direzione delle linee di forza, un protone, quando è sottoposto all'influenza di un campo magnetico esterno, comincia a ruotare attorno al proprio asse con un movimento di precessione, caratterizzato da un angolo di inclinazione e da una velocità angolare, che è proporzionale all'intensità del campo magnetico applicato. Pertanto, l'applicazione di un campo magnetico esterno ha determinato, a livello dei protoni, il loro allineamento lungo la direzione del campo magnetico e la creazione di un movimento di precessione con velocità angolare costante.

A questo punto, si va a perturbare questo equilibrio, andando a interagire con i protoni, cedendo loro energia. La cessione di energia è possibile attraverso l'uso di una radiofrequenza esterna che abbia una frequenza d'onda corrispondente alla frequenza di precessione del protone in esame; in altre parole lo scambio di energia può avvenire solo se le due frequenze entrano in risonanza tra loro.

La cessione di energia al sistema comporta due importanti conseguenze: si riequilibra il numero degli spin in direzione parallela ed antiparallela, abbattendo completamente la magnetizzazione longitudinale indotta dal campo magnetico esterno e causata dall'eccesso di protoni orientati in direzione parallela; i vari protoni cominciano a precedere in fase, cioè

sincronizzano la loro precessione sul piano trasversale, creando una nuova magnetizzazione, detta appunto magnetizzazione trasversale.

Interrotto l'impulso a radiofrequenza e quindi la immissione di energia al sistema rotante degli spin, questi tenderanno a tornare alla condizione di equilibrio, cedendo energia che può essere rilevata come segnale RM con un'antenna apposita.

Una volta cessato l'impulso esterno di radiofrequenza, si avranno due fenomeni diversi, ma contemporanei: la perdita della coerenza di fasce sul piano trasversale e quindi della magnetizzazione trasversale e il ripristino del disequilibrio tra spin in posizione parallela ed antiparallela, con il progressivo recupero della magnetizzazione longitudinale. Il primo fenomeno è descritto da una costante di tempo, il tempo di rilassamento T2, che corrisponde alla perdita della magnetizzazione trasversale fino al 37 % del valore originario; il secondo fenomeno è definito tempo di rilassamento T1, e corrisponde al recupero del 63 % della magnetizzazione longitudinale originaria.

Durante questo fenomeno avviene una cessione di energia da parte dei protoni dei tessuti sotto forma di onde elettromagnetiche che possono essere rilevate mediante un'antenna. Questa cessione di energia corrisponde al segnale RM.

3.3.2.1.1 Le nanoparticelle come mezzi di contrasto per risonanza magnetica

I protoni dei diversi tessuti reagiscono in modo diverso, dando così un'immagine delle diverse strutture anatomiche. Queste immagini possono essere migliorate aggiungendo i mezzi di contrasto capaci di simulare il comportamento dei protoni nel luogo in cui si vanno a posizionare.

Durante l'analisi si valuta come gli agenti di contrasto viaggiano attraverso il sistema circolatorio e nei tessuti aumentando il contrasto ovunque essi vadano [Berry e Curtis, 2003].

I mezzi di contrasto per risonanza magnetica includono oggi una varietà di molecole che possono essere ricondotte a due categorie principali: i mezzi di contrasto paramagnetici e i superparamagnetici. Si tratta in ambedue i casi di ioni metallici legati a strutture chimiche organiche che prendono il nome di chelanti che hanno l'obiettivo di ridurre la tossicità intrinseca, infatti, la loro unione fa in modo di creare un composto termodinamicamente e cineticamente stabile il quale è molto meno tossico. Tali mezzi di contrasto vengono iniettati per via endovenosa e determinano un mutamento del campo magnetico locale a livello dei tessuti normali e patologici nei quali si distribuiscono [Pozzi Mucelli 2004]. Tali mezzi di contrasto, rappresentano, inoltre, motivo d'interesse poiché non trattengono alcuna forma di magnetismo dopo aver rimosso il campo magnetico esterno [Hofmann ed altri, 2001]. La

modificazione del campo magnetico comporta una modificazione dell'intensità del segnale che può essere positiva o negativa nel senso di un aumento o di una diminuzione dell'intensità del segnale.

I mezzi di contrasto paramagnetici sono sostanze caratterizzate dalla presenza di elettroni spaiati: in generale, tanto maggiore è il numero di elettroni spaiati posseduti dall'atomo nella sua configurazione più esterna, tanto maggiore sarà il grado di paramagnetismo. Gli ioni metallici dotati di questa proprietà sono il ferro, il manganese e i lantanidi; tra questi il gadolinio è quello che possiede il più elevato numero di elettroni spaiati (7) e per questo motivo è l'elemento più usato [Pozzi Macelli, 2004]. I chelanti del gadolinio però tendono ad essere non specifici e ad accumularsi nel fegato rapidamente, permettendo così di avere una rappresentazione di immagini breve nel tempo [Berry e Curtis, 2003].

I nanocompositi chiamati MION (monocrystalline iron oxide) sono relativamente nuovi e rappresentano un'area di notevole sviluppo nell'ambito degli agenti di contrasto. Ci sono sul mercato molte varietà di reagenti MION, quali Feridex I.V.TM, EndodermTM (con diametro di 150 nm usato per il tratto gastrointestinale, il fegato e la milza), GastromarkTM, LumiremTM (nanoparticelle dal diametro di 300 nm, rivestite di silicone), SineremTM (particelle di magnetite dal diametro di 30 nm, usata, anche, per la rilevazione dei tumori) ed altri ancora, ciò ci fa comprendere che l'ultima parola in tale settore deve ancora dirsi.

I mezzi di contrasto superparamagnetici sono in genere formati da particelle di ossido di ferro con dimensioni molto variabili da un minimo di 30 nm fino ad un massimo di 300 nm. Tali prodotti vengono indicati con delle sigle particolari, SPIO -superparamagnetic iron oxide- e USPIO -ultrasmall superparamagnetic iron oxide- [Pozzi Macelli, 2004]. Le nanoparticelle SPIOs hanno dimensioni superiori a 50 nm, rivestimento incluso, mentre le USPIOs sono inferiori ai 50 nm. Le dimensioni delle nanoparticelle influenzano le proprietà fisicochimiche e quelle farmacologiche [Berry e Curtis, 2003].

I mezzi di contrasto superparamagnetici vengono captati selettivamente dal sistema reticolo endoteliale presente nel fegato, nella milza e nei linfonodi. Sono di forma irregolare e capaci di assorbire molta luce. Per questa proprietà vengono usate nello studio degli organi che sono stati sopra citati, in quanto inducono una marcata riduzione dell'intensità del segnale. Di norma tale riduzione si ha nei tessuti sani in quanto i tessuti patologici (cellule tumorali) non possedendo il sistema reticolo endoteliale, mantengono inalterato il loro segnale. Per questo motivo i mezzi di contrasto superparamagnetici vengono definiti negativi, al contrario dei paramagnetici che sono definiti positivi [Pozzi Macelli, 2004].

I composti SPIOs, sono agenti di contrasto molto promettenti in quanto le loro proprietà possono essere finemente studiate per applicazioni specifiche. Essi sono non tossici e vengono facilmente quanto rapidamente eliminati dall'organismo.

Biologicamente parlando, il requisito principale è che le cellule siano capaci di catturare le particelle magnetiche alle quali sono esposte e che le inglobino per endocitosi. Il processo di endocitosi è un processo grazie al quale materiale di ordine di grandezza nanometrica viene ingerito dalle cellule [Berry e Curtis, 2003].

3.3.2.2 Drug delivery

I principali problemi associati attualmente alla somministrazione dei farmaci includono la loro omogenea distribuzione in tutto l'organismo; i farmaci mancano di specificità da ciò nasce l'esigenza di grandi dosi per avere un'alta concentrazione locale.

Quando assumiamo un farmaco, sia esso in pastiglia, in sciroppo o attraverso un' iniezione, quasi sempre immettiamo indiscriminatamente nell'organismo un principio attivo che si spera vada a curare, o a colpire, dove si trovano, le cellule malate o infiammate, ma che intanto va in giro a danneggiare anche le cellule sane, provocando i noti effetti collaterali.

Generalmente i farmaci vengono somministrati per via orale o attraverso iniezioni intravenose.

Nel caso di dosi orali, la concentrazione nel tempo di farmaco nel sangue inizialmente cresce in modo rapido, fino ad un valore massimo e successivamente, nel momento in cui il farmaco viene metabolizzato, il livello decresce lentamente.

Nelle iniezioni invece una volta raggiunto il livello massimo di concentrazione nel sangue, il livello decresce in maniera esponenziale.

Per avere efficacia, la concentrazione di farmaco dovrebbe essere mantenuta all'interno di un certo livello terapeutico tipico, nel quale i farmaci risultano tossici al di sopra del limite superiore, di tale intervallo, e inefficaci al di sotto di esso (figura 6).

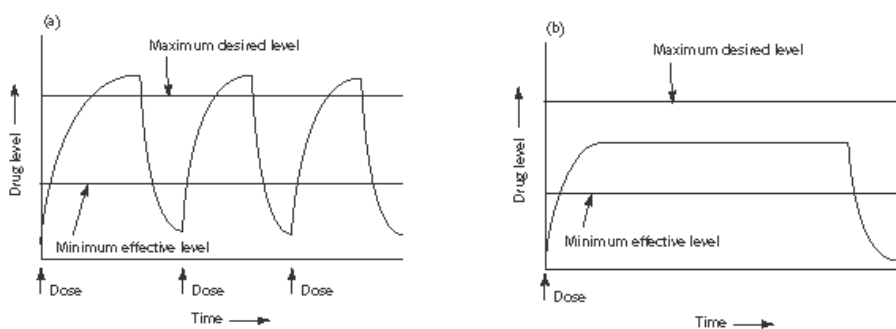


FIGURA 6. Profili dei livelli di farmaco nel tempo ottenuti per una terapia farmacologica tradizionale (A) e per una terapia a base di farmaci a rilascio controllato (B).

Nelle usuali forme di somministrazione non si riesce a mantenere la concentrazione di farmaco all'interno dell'intervallo terapeutico per molto tempo, infatti il livello di farmaco tende a fluttuare all'interno di quest'ultimo. Tali problematiche hanno sollecitato lo sviluppo di sistemi di somministrazione controllata: drug delivery system.

L'uso di nanoparticelle trasportatori di farmaci è oggi l'epicentro delle moderne strategie di drug delivery. Paul Ehrlich menzionò per primo questo concetto nel 19esimo secolo. Lui descrisse una "pallottola magica" capace di trasportare i farmaci direttamente nella cellula bersaglio in modo da non agire sulle cellule circostanti.

Le nanoparticelle sono particelle colloidali solide che variano in dimensioni dai 10 nm ai 1000 nm. Esse consistono in materiali macromolecolari nei quali il principio attivo è dissolto, intrappolato, o incapsulato, e/o al quale il principio attivo è assorbito o attaccato [Panyam ed altri, 2002].

Le nanoparticelle esibiscono molte proprietà tra le quali l'alta stabilità e l'abilità di modificare facilmente le loro caratteristiche di superficie.

I requisiti che un vettore ideale per il trasporto di farmaci deve avere sono, la capacità di prolungare la circolazione nel flusso sanguigno, deve essere piccolo abbastanza in modo da poter avere accesso ai tessuti e alle cellule bersaglio, deve avere tropismi flessibili per l'applicabilità in un range di possibili bersagli, deve essere abile a trasportare la parte attiva nelle cellule e deve essere capace di evitare il sistema endosoma-lisosoma.

Oggi ci sono differenti materiali biocompatibili per fabbricare nanoparticelle ed anche differenti metodi di fabbricazione.

Oltre alla biocompatibilità, uno dei requisiti più importanti, per qualsiasi tipo di materiale usato per la produzione di nanoparticelle è che la matrice sia biodegradabile. La distribuzione nel corpo e l'eliminazione di modelli di sistemi macromolecolari sono dettati principalmente dalle loro proprietà fisicochimiche. Dopo l'iniezione endovenosa, particelle più grandi di 5-7 μm in diametro sono capaci di arrivare nei polmoni, mentre quelle con un diametro inferiore ai 5 μm sono capaci di arrivare al sistema del reticolo endoteliale (RES).

E' stato dimostrato che rivestire la superficie delle particelle con materiali di rivestimento differenti può modulare la distribuzione nell'organismo delle particelle stesse [Raimar Löberberg, 2003].

Lo sviluppo di una terapia efficiente basata su farmaci macromolecolari, come geni e proteine, è influenzata da un trasporto intracellulare sicuro ed efficiente. Esistono, infatti, un certo numero di barriere che tali macromolecole devono superare prima di poter entrare nelle

cellule, tra queste la scarsa permeabilità e la spinta selettività delle membrane cellulari affiancata ai processi di degradazione intracellulari realizzati ad opera dei lisosomi a seguito dell'endocitosi [Panyam ed altri, 2002].

Le nanoparticelle di PLGA (acido poli-lattico-co-glicolico) sono capaci di distribuire una vasta varietà di agenti terapeutici, incluse macromolecole come DNA e farmaci a basso peso molecolare come desametasone, nelle cellule a piccole dosi, ciò dà luogo ad un numero notevole di effetti terapeutici. Il PLGA ha un numero di vantaggi maggiore rispetto ad altri polimeri usati nel drug delivery e nella gene therapy, tra questi la biodegradabilità, la biocompatibilità e l'approvazione dalla Food and Drug Administration.

Il PLGA si è mostrato capace di attraversare la barriera endosomale e a trasportare gli agenti terapeutici in esso incapsulati nel citoplasma. Le nanoparticelle di PLGA, contenenti agenti terapeutici intrappolati nella matrice polimerica, provvedono ad un rilascio sostenuto di farmaco.

La degradazione del PLGA produce acido lattico e glicolico i quali sono facilmente metabolizzati dall'organismo mediante il ciclo di Krebs per poi essere eliminati. Quindi le nanoparticelle di PLGA offrono i vantaggi di sicurezza, la capacità di trasportare classi differenti di agenti terapeutici oltre che la possibilità di trasportare una considerevole quantità di farmaco nel citoplasma, proprio come è richiesto da un buon sistema di drug delivery [Panyam ed altri, 2002].

Nei sistemi di drug delivery il medicinale viene associato con una molecola capace di un riconoscimento specifico. Il riconoscimento specifico si può avere a livelli diversi: a livello dell'organo interno, di un determinato tipo cellulare per un determinato organo, o a livello dei componenti individuali delle cellule come gli antigeni sulle membrane cellulari [Berry e Curtis, 2003].

Nel lontano 1970 fu proposto l'uso di nanoparticelle magnetiche come supporto per raggiungere zone specifiche (generalmente tumori) dell'organismo. Gli obiettivi erano due: ridurre la quantità di farmaco, che, distribuito in zone del corpo diverse dal sito specifico, può dare origine ad effetti collaterali, e, quindi, poter anche ridurre il dosaggio richiesto. Nella terapia che fa uso di nanoparticelle magnetiche, il farmaco viene unito ad una nanoparticella magnetica che funge da trasportatore. Questi complessi medicina/portatore sono iniettati nel sistema circolatorio del paziente. Una volta iniettati nel flusso sanguigno, vengono usati dei campi magnetici esterni per concentrare il complesso ad una zona specifica che non interessa quindi le strutture circostanti (figura 7).

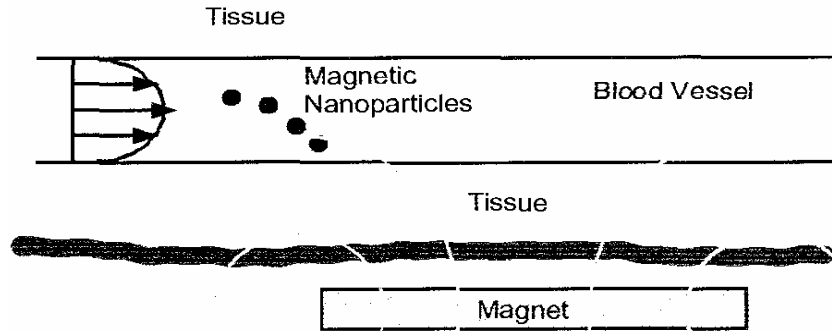


FIGURA 7. Schema, in sezione trasversale, di un sistema di drug delivery magnetico: un magnete, posizionato all'esterno del corpo, genera un campo magnetico esterno capace di indirizzare le nanoparticelle magnetiche nel sistema vascolare [Pankhurst ed altri, 2003].

L'efficacia della terapia dipende da molti parametri fisici che includono la forza del campo applicato e le proprietà volumetriche, oltre che magnetiche, delle nanoparticelle.

In generale, le particelle più grandi sono più resistenti ai flussi dinamici che si hanno all'interno del sistema circolatorio, in particolare nelle vene e nelle arterie.

Nella maggior parte dei casi il campo magnetico esterno è generato da un forte magnete permanente, come un Nd-Fe-B, fissato all'esterno del corpo sulla zona da trattare.

Alcuni studi hanno dimostrato che la densità del flusso sulla zona da trattare deve essere dell'ordine di 0,2 T con un gradiente del campo pari a circa 8 Tm^{-1} per l'arteria femorale, maggiore di 100 Tm^{-1} per l'arteria della carotide. Ciò ci fa comprendere che il bersaglio è raggiunto molto più efficacemente in regioni a basso flusso sanguigno, in particolare se la zona da bersagliare è chiusa dal magnete. Dai primi trasportatori di polimeri magnetici realizzati nel 1970 siamo arrivati, oggi, ad avere una grande varietà di nanoparticelle magnetiche. L'ottimizzazione di questi trasportatori continua ancora oggi. Generalmente, il componente magnetico delle nanoparticelle è rivestito con un polimero biocompatibile come il PVA o il dextrano, attualmente sono stati scoperti altri possibili rivestimenti come il silicio. Il rivestimento agisce difendendo la particella magnetica dagli attacchi dell'ambiente circostante e possono anche essere funzionalizzate con gruppi di carbossilici che legano, biotina, avidina, carboidi-immide ed altre molecole. Queste molecole vengono poi usate come punti di attacco per farmaci o di anticorpi che devono essere trasportati nel sito specifico.

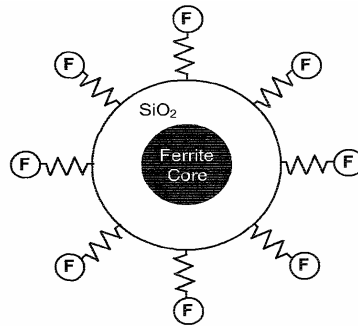


FIGURA 8. Funzionamento di una nanoparticelle magnetica in cui il centro è rivestito con uno strato di silice, SiO_2 , e la cui superficie possiede dei gruppi funzionali [Pankhurst ed altri, 2003].

I trasportatori generalmente possono avere due configurazioni strutturali: una particella magnetica rivestita con un polimero biocompatibile, oppure un polimero biocompatibile poroso in cui le nanoparticelle magnetiche sono fatte precipitare nei pori.

Trasportatori di cobalto/silice sono stati recentemente usati per operazioni chirurgiche atte a riparare il distacco della retina [Pankhurst ed altri, 2003] (figura 8).

Per i sistemi di drug delivery grande rilevanza è stata data alle proprietà di superficie delle nano/microsfere polimeriche che vengono ad essere usate. Queste, infatti, dovranno essere tali da prevenire la loro rapida rimozione per opsonizzazione. La reazione di opsonizzazione avviene ad opera delle opsonine, proteine contenute nel siero del sangue, che rendono possibile la fagocitosi dei materiali corpuscolati da parte dei monociti-macrofagi. Tali problematiche riguardano, ovviamente, quei sistemi che vengono somministrati per via endovenosa.

La rimozione di nanoparticelle, da parte dei monociti-macrofagi, comincia con l'assorbimento di proteine sulla superficie particellare. Per evitare ciò, è possibile rivestire le nanoparticelle con un polimero idrofilico, non ionico, conosciuto con il nome di PEG (polietilenglicole). Il peso molecolare del PEG e la sua concentrazione di superficie, così come la conformazione molecolare, sono fondamentali per realizzare nanoparticelle che non consentano l'assorbimento [Meng et al., 2004]. I polimeri di PEG sono i più usati per modificare il rivestimento delle nanoparticelle ed evitare così il riconoscimento da parte del sistema reticolo-endoteliale [Gref et al., 2000].

Per resistere all'assorbimento proteico sono necessarie lunghe catene di PEG ed una sua alta concentrazione di superficie.

Una superficie rivestita di PEG può essere realizzata usando varie strategie di stabilizzazione, ad esempio radiofrequenze o formando monolayers auto-assemblati. Comunque, ottenere delle nanosfere rivestite di PEG con tali metodi può far sì che i copolimeri della particella affiorino al contatto con il sangue. Particelle rivestite di PEG possono essere, inoltre, ottenute

da polimerizzazione di emulsioni di PEG contenenti monomeri e dalla formazione di nanoparticelle contenenti copolimeri di PEG. Ciononostante, questi metodi hanno delle limitazioni riguardo al peso molecolare del PEG che può essere usato, la taglia delle particelle ottenute e la densità del PEG [Gref et al., 2000].

Il rivestimento in PEG racchiude un'anima che può essere di PLA (acido polilattico), PLGA (acido poli-lattico-co-glicolico) oppure di PCL (poli-caprolattone). Sono state preparate una serie di nanoparticelle di varie dimensioni per testarne l'efficacia; le dimensioni variano da 160-270 nm. Le nanoparticelle contenevano, inoltre, diverse concentrazioni di PEG che oscillavano da 2000- 20 000 g/mole. Tali studi hanno osservato una considerevole riduzione dell'assorbimento, pari al 57 % rispetto alle nanoparticelle formate solo da PLA, PLGA, PGA [Gref et al., 2000].

3.3.2.2.1 Applicazione delle nanoparticelle per il drug delivery alla barriera ematoencefalica (BEE).

La barriera emato-encefalica è semipermeabile: si lascia attraversare da alcune sostanze, ma non da altre. Il trattamento farmacologico di patologie neurologiche e psichiatriche è spesso complicato dall'incapacità dei farmaci di attraversare la barriera ematoencefalica (BEE), la quale è formata dall'endotelio dei vasi del cervello, dalla membrana basale e dalle cellule neurogliali. Le proprietà fisicochimiche dei farmaci, ad esempio, il loro peso molecolare, determinano quale sarà l'estensione dei farmaci attraverso la BEE. I farmaci che non sono ionizzati al pH fisiologico e a basso peso molecolare possono attraversare la BEE grazie a meccanismi di diffusione. Altri composti, come amminoacidi e neuropeptidi, normalmente necessitano di trasportatori specifici. Inoltre, peptidi e proteine possono attraversare la BEE tramite sistemi di trasporto saturabili, ottenuti dall'uso di citochine. Per superare la BEE, e trasportare farmaci al cervello, sono stati sviluppati diversi metodi. Molti di questi metodi sono caratterizzati, per esempio, dall'apertura osmotica della BEE o dall'uso di agenti biologicamente attivi (es. istamine, serotonina, radicali liberi di ossigeno, citochine, metalloproteinasi, ecc.). L'uso dei trasportatori di farmaci, come liposomi e nanoparticelle, è stata considerata come una possibile soluzione. Uno dei problemi principali del drug delivery è la rapida opsonizzazione e la compressione dei sistemi di distribuzione in altre parti dell'organismo. Un vantaggio dell'uso di nanoparticelle può essere la riduzione della dose terapeutica, la quale riduce i danni collaterali dei farmaci. Studi condotti da Schroeder ed altri, hanno testato la funzione analgesica di peptidi quali il dalargin e il kyotorphin, farmaci incapaci di attraversare la BEE a causa della loro idrofilicità. Lo scopo di questo studio è stato

quello di dimostrare se le nanoparticelle sono adatte ad intensificare la concentrazione di farmaci nel cervello. Come farmaco modello è stato scelto un antidepressivo triciclico, l'amitriptyline, che solitamente riesce a superare la BEE. Nel caso del dalargin, le particelle rivestite con polysorbate80 si sono mostrate capaci di indurre effetti analgesici, come anche quelle rivestite con polysorbate85 stabilizzate. Le nanoparticelle caricate con kyotorphin hanno indotto effetti analgesici solo quando il loro assorbimento è stato realizzato con dextran70 000 stabilizzato [Schroeder et al., 1998].

3.3.2.3 Gene therapy

Un'altra possibilità è quella di veicolare nelle cellule frammenti di DNA attraverso nanodispositivi, ovvero, attraverso una sorta di nanoterapia genica. Per terapia genica si intendono quegli interventi medici che comportano modificazioni deliberate del materiale genetico di cellule viventi allo scopo di prevenire, curare o diagnosticare situazioni patologiche nell'uomo. Le cellule possono essere modificate in vivo attraverso prodotti somministrati direttamente al soggetto, oppure ex vivo attraverso manipolazioni o processi che ne modificano le caratteristiche genetiche prima della somministrazione.

Il gene sano può essere trasferito nelle nanoparticelle che lo trasportano fino al nucleo dove sarà capace di funzionare al posto di quello malato. Un vantaggio delle nanoparticelle è che il loro viaggio può essere seguito in tempo reale grazie ad uno speciale microscopio capace di captarne la fluorescenza. Questo nuovo modo di condurre la terapia genica potrebbe mandare in pensione i virus finora usati come vettori del gene, a tutto vantaggio del paziente che lo riceve. Nei tentativi di terapia genica eseguiti finora in diversi laboratori del mondo gli esperti si sono infatti serviti di virus resi innocui con modifiche genetiche. Il gene da trasferire viene inserito nel menoma virale e, quindi, "impacchettato" nel capsido.

La gene therapy, per adempiere allo scopo d'introdurre materiale genetico nelle cellule, può far uso, quindi, di diversi vettori siano essi virus, lipidi, carriers biodegradabili (es. collagene) e più recentemente nanodispositivi. La molecola che viene inserita nel polimero è un gene che codifica una determinata risposta cellulare. I virus hanno evoluto la capacità d'interagire specificamente con la superficie cellulare e trasferire materiale genetico in maniera estremamente efficiente. Il vettore interagisce specificamente con la superficie cellulare, viene endocitato e il materiale genetico liberato nel citoplasma, fino a raggiungere il nucleo. Qui, l'informazione contenuta nel materiale virale, verrà ritenuta erroneamente appartenere alla cellula e usata, quindi, per la sintesi delle proteine estranee.

I virus usati per la gene therapy dovranno essere privati dei loro acidi nucleici in modo da poter fungere da gabbie proteiche e trasportare i materiali in essi incapsulati. Le gabbie proteiche virali hanno tre distinte interfacce che possono essere al contempo manipolate chimicamente e geneticamente per permettere la realizzazione dello scopo che ci si è proposti. Queste sono la superficie esterna, interna e l'interfaccia tra le subunità che comprendono il guscio proteico. Tutte e tre le interfacce sono suscettibili delle modificazioni sia genetiche che chimiche e possono essere usate oltre che per la gene therapy e il drug delivery anche per la somministrazione di mezzi di contrasto usati per la realizzazione di bioimmagini, come la risonanza magnetica [Allen et al., 2005].

L'uso dei virus, quali vettori di materiale genetico, porta con se il rischio di reazioni immunitarie conseguenti all'iniezione del virus-vettore nel corpo del paziente. Infatti, anche se reso innocuo, il virus può pur sempre scatenare una risposta immunitaria e vanificare la cura, oppure, in seguito a ricombinazione genica, il virus può ritornare ad essere patogeno e, quindi, pericoloso per l'uomo.

Per veicolare nelle cellule frammenti di DNA possono essere usate anche nanoparticelle magnetiche, le applicazioni in questo settore stanno trovando negli ultimi anni un largo sviluppo. Il trasportatore, in tale caso, raggiunge la zona d'interesse grazie ad un campo magnetico esterno che permette in pratica il suo instradamento. Inoltre in questo modo il trasportatore entra in contatto con il tessuto per un lungo periodo di tempo, incrementando così l'efficienza del trasferimento e quindi l'espressione del gene [Pankhurst et al., 2003].

Virus e tossine peptidiche usano un peptide fusogeno per attraversare la membrana endosomica ed arrivare al citosol. Vettori non virali come i lipidi cationici e policationici proteggono il DNA sia ritardando il trasferimento del DNA dagli endosomi ai lisosomi che destabilizzando le membrane endo-lysosomal. Comunque questi fattori, come già accennato, soffrono di un numero di limitazioni incluso l'immunogenicità, la tossicità e l'instabilità in vivo [Panyam et al., 2002].

Le PTDs (protein transduction domains), sono domini proteici capaci di far attraversare le membrane cellulari senza endocitosi e si sono dimostrate utili per trasportare vari peptidi e proteine nelle cellule. Comunque, questi vettori PTDs hanno un certo numero di limitazioni, poichè essi hanno bisogno di essere legati covalentemente alla proteina o al peptide da colpire.

Così, è nata la necessità di trovare un trasportatore non tossico e biodegradabile: il PLGA. Le nanoparticelle di PLGA (acido poli-lattico-co-glicolico) sono capaci di distribuire, quindi, oltre ai farmaci, anche macromolecole di DNA all'interno delle cellule [Panyam et al., 2002].

In linea teorica, tutte le malattie possono essere trattate attraverso interventi sull'espressione genica. Comunemente, si pensa che la terapia genica sia utile per guarire malattie ereditarie quali distrofia muscolare, fibrosi cistica, emofilia, diabete di tipo I, malattie metaboliche (fenilchetonuria), anomalie fisiologiche (mucopolisaccaridosi, sindrome di Gaucher etc.). In realtà con questa terapia possono essere trattate anche malattie che colpiscono chi è geneticamente predisposto, ma che dipendono fortemente da fattori ambientali, come cancro, malattie cardiovascolari, malattie neurodegenerative (morbo di Alzheimer, morbo di Parkinson etc.). Infine la terapia genica può trattare anche malattie acquisite quali traumi di vario tipo (fratture ossee, ferite, ustioni) ed ischemie (necrosi dei tessuti causate da un'interruzione dell'apporto sanguigno).

3.3.2.4 Ipertermia

Arsène D'Arsoval (1851-1940), nel corso dei suoi studi sulle correnti ad alta frequenza, scoprì che una corrente elettrica, alla frequenza di 10kHz o più, produceva una sensazione di calore nell'attraversare i tessuti (diatermia), senza essere accompagnata dalla contrazione muscolare dolorosa, che si verifica a più basse frequenze. Il riscaldamento dei tessuti tramite campi elettromagnetici presenta alcuni vantaggi rispetto alle altre forme di riscaldamento (conduzione, radiazione infrarossa): è possibile agire, infatti, anche su tessuti localizzati in profondità. Le principali applicazioni cliniche dell'ipertermia sono legate alla fisioterapia ed in particolare alla cura dei tumori. L'ipertermia, con l'avvento di nuove apparecchiature più performanti, si propone oggi come possibile scelta terapeutica in campo oncologico, non solo come alternativa, ma in associazione con le terapie tradizionali (chemioterapia, radioterapia, immunoterapia).

Attraverso l'uso di campi elettromagnetici a radiofrequenza, focalizzati da apposite antenne (ipertermia transcutanea loco-regionale), l'organo bersaglio è riscaldato fino ad una temperatura vicina o superiore ai 43°C, per circa 60 minuti. Il trattamento, cioè il riscaldamento alle temperature suddette, può essere eseguito più volte, secondo i protocolli, ma generalmente non viene ripetuto più di tre volte alla settimana, per evitare il fenomeno della tolleranza, cioè la maggiore resistenza cellulare al calore nelle 48 ore successive alla terapia. È possibile anche, con apparecchiature differenti riscaldare tutto l'organismo (ipertermia corporea totale) o direttamente le lesioni tumorali, introducendo appositi aghi, sotto guida ecografia, per via transcutanea (ipertermia interstiziale). Il calore trasferito ai tessuti direttamente dall'esterno per conduzione e convezione (sorgente esogena) non ha capacità di penetrazione, quindi per andare in profondità è necessario ricorrere ad una

sorgente endogena, cioè una forma di energia adatta a raggiungere l'interno dei tessuti per poi convertirsi in calore.

L'interesse dell'ipertermia in oncologia è andato crescendo, in questi ultimi anni; è stato, infatti, dimostrato che la radioterapia e la chemioterapia, se usate in associazione con trattamenti di ipertermia, possono avere, a parità di dose, una maggiore efficacia o conservare la stessa efficacia, a dosi inferiori.

Il calore potenzia gli effetti della radioterapia e della chemioterapia sul tumore, senza aumentarne gli effetti collaterali (cioè gli effetti debilitanti su tessuti sani derivanti dalla citotossicità della radioterapia e della chemioterapia), permettendo un significativo miglioramento nel controllo della crescita tumorale. Ciò è reso possibile dalle caratteristiche della neovascolarizzazione tumorale: i vasi tumorali, infatti, privi dell'impalcatura muscolare, non consentono, per mancanza di elasticità, quella vasodilatazione fisiologica che permette un'adeguata dissipazione del calore introdotto. In altri termini, il calore rimane intrappolato nelle lesioni tumorali generando apoptosi.

Un altro considerevole vantaggio dell'ipertermia è costituito dal fatto che l'attività immunitaria del malato, solitamente depressa dalla malattia stessa e/o dalle cure messe in atto per controllarla, viene potenziata dall'ipertermia: questa, mimando il meccanismo di difesa fisiologica rappresentato dalla febbre, provoca la liberazione di sostanze immunoregolatrici (le citochine), le quali hanno effetto protettivo per l'organismo del malato [Berry e Curtis, 2003].

L'inevitabile problema tecnico, legato all'ipertermia, è la difficoltà di riscaldare uniformemente la sola regione tumorale alla temperatura richiesta senza danneggiare il tessuto normale. Le nanoparticelle somministrate di solito migrano nei sistemi del reticolo endoteliale come i macrofagi e le cellule di Kupffer nel fegato, nella milza e nei linfonodi. I linfonodi sono i siti nei quali i tumori metastatici facilmente crescono. Tuttavia la somministrazione di nanoparticelle è passiva e il suo controllo, quindi, è molto difficile [Shinkai, 2002].

Nel 1979 Gordon ed altri, per primi, proposero il concetto di ipertermia intracellulare usando nanoparticelle di magnetite dextrano. Somministrarono nanoparticelle, per via intravenosa, ai ratti Sprague-Dawley, affetti da carcinomi mammari e mostrarono che vi era un riscaldamento da campo magnetico indotto nei loro esperimenti in vivo [Shinkai, 2002].

Più recentemente la ricerca ha focalizzato la sua attenzione sull'uso di fluidi magnetici direttamente iniettati nella massa tumorale, o in un'arteria ad essa afferente. Tra le loro proprietà più importanti vi sono la non tossicità, la biocompatibilità, l'iniettabilità e l'alto livello di accumulo nella massa tumorale oltre che l'effettivo assorbimento dell'energia dei

campi magnetici applicati [Shinkai, 2002]. Il metodo conta sulla teoria che alcuni oggetti metallici quando inseriti in un campo magnetico variabile generano delle correnti indotte che circolano al loro interno. L'ammontare della corrente è proporzionale all'estensione del campo e dell'oggetto.

Quando un fluido magnetico è esposto ad un campo magnetico variabile le particelle divenute fonti di calore potenti distruggono le cellule tumorali. I fluidi magnetici preferibilmente usati sono delle sospensioni di particelle superparamagnetiche, capaci di produrre più calore per unità di massa rispetto alle particelle più grandi.

La quantità di materiale magnetico richiesto, per produrre le temperature necessarie, dipende dall'estensione e dal metodo di somministrazione. Per esempio, l'iniezione diretta fornisce grandi quantità di materiale che può essere localizzato direttamente sul tumore.

Un'assunzione ragionevole è di circa 5-10 mg di materiale magnetico concentrato in ogni cm^3 del tessuto tumorale [Pankhurst et al., 2003]. Per quanto riguarda i materiali, la magnetite di ossido di ferro (Fe_3O_4) e la maghemite ($\gamma-Fe_2O_3$) sono i più studiati. Generalmente le loro proprietà magnetiche e biologiche sono compatibili, sebbene molti altri materiali sono oggetto di studio. Le dimensioni sono intorno ai 10 μm , considerate abbastanza piccole per interagire con la massa tumorale.

I materiali prescelti sono divisi in due importanti classi; ferromagnetici o superparamagnetici. I meccanismi di generazione di calore sono abbastanza differenti a seconda del tipo di materiale [Pankhurst et al., 2003]. Anche le dimensioni sono di notevole importanza al fine di ottenere delle percentuali di assorbimento (SAR) piuttosto alte, nel caso della magnetite, il SAR di particelle con un diametro di 35 nm è circa due volte maggiore rispetto a quello ottenuto con particelle di 10 nm. L'accumulo di nanoparticelle nelle cellule tumorali può essere aumentato modulando la carica della loro superficie. Liposomi cationici di magnetite, ad esempio, con carica di superficie positiva, mostrano un'affinità 10 volte più alta per le cellule di glioma rispetto ai magnetoliposomi caricati neutralmente. Essi hanno un SAR sufficientemente alto e una biocompatibilità generale che è comparabile a quella della magnetite di dextranso [Shinkai, 2002].

Ohno ed altri hanno migliorato il metodo di somministrazione delle nanoparticelle tramite l'utilizzo di magnetite aghiforme. La magnetite aghiforme è composta da nanoparticelle magnetiche e cellulosa carbossimetilica (figura 9).



FIGURA 9. Fotografia di magnetite aghiforme. Diametro medio 0,6 mm [Shinkai, 2002].

Si tratta di un materiale capace di disperdersi in acqua gradualmente. Le nanoparticelle, di tale materiale, sono facilmente rimosse dal flusso sanguigno, perciò non è necessario rimuovere gli aghi dopo il trattamento terapeutico. Questo metodo, ancora in via sperimentale, è stato applicato ad un ratto affetto da tumore al cervello con risultati soddisfacenti.

L'ultima frontiera prevede l'uso di nanoparticelle coniugate con anticorpi, capaci di indirizzarsi da sole verso le cellule tumorali una volta inserite nell'organismo per endovenosi [Shinkai, 2002].

Tra le patologie neoplastiche attualmente trattabili con l'ipertermia vi sono i tumori alla mammella, i melanomi, i sarcomi, le adenopatie superficiali, e tumori profondi quale quello alla prostata, al pancreas, al fegato, all'utero, alla vescica, al retto, i tumori genitali femminili, i tumori all'addome superiore e ai polmoni (figura 10).

PATOLOGIE NEOPLASTICHE TRATTABILI CON IPERTERMIA	
TUMORI SUPERFICIALI	TUMORI PROFONDI
Melanomi	Polmone
Epiteliomi	Pleura
Sarcomi parti molli	Pancreas
Metastasi cutanee	Pelvi
Tumori ossei superficiali	Fegato
Tumori tessuti connettivali	Ossa profonde
Pacchetti linfonodali	Colon
Recidive superficiali	Reni
	Stomaco
	Vescica
	Cervello
	Lingua-Faringe
	Testa-Collo
	Laringe
	Prostata
	Massiccio facciale
	Mandibola
	Guance
	Arti
	Organi genitali maschili
	Organi genitali femminili

FIGURA 10. Schema delle patologie che possono essere trattate con l'ipertermia.

-CAPITOLO 4-
RISPOSTA CELLULARE A MATERIALI NATURALI
EFFETTO DELLA COMPOSIZIONE DELLA
MATRICE SUL DIFFERENZIAMENTO DI CELLULE
STAMINALI EMBRIONALI

INTRODUZIONE

Uno degli schemi più recenti e ambiziosi dell'ingegneria dei tessuti presuppone di coltivare cellule staminali embrionali (ES) in scaffold degradabili allo scopo di ottenere qualsiasi tipo di tessuto attraverso il controllo e la guida del loro differenziamento. Purtroppo, esistono ancora molteplici ostacoli alla rigenerazione di tessuti tridimensionali (3D) vitali complessi a partire da costrutti di cellule ES e biomateriali, a causa della scarsa comprensione dei meccanismi che sono alla base del differenziamento e del "commitment" verso specifiche linee differenziate. È stato dimostrato che cellule ES incapsulate in materiali 3D possono essere indotte a differenziare facendo variare le condizioni di coltura e favorendo la formazione di strutture cistiche pluricellulari, conosciute col nome di corpi embrioidi (EBs) [Keller, 1995]. Numerosi stimoli biochimici solubili, quali ad es. l'acido retinoico (RA), le citochine e gli ormoni insulina e T3, possono indurre il differenziamento delle cellule ES verso pattern specifici [Bain et al., 1995; Uzan et al., 1998; Dani, 1999]. È stato dimostrato, per esempio, che RA favorisce il commitment degli EBs verso il differenziamento ectodermico [Bain et al., 1995]. Ciononostante, il controllo e la guida della proliferazione e del differenziamento in tessuti altamente ordinati non sono ancora stati raggiunti. Durante lo sviluppo embrionale in vivo, non solo i segnali biochimici solubili, ma anche i componenti macromolecolari della matrice extracellulare (ECM) possono giocare un ruolo importante nel definire e guidare il processo. Infatti, oltre a fornire un supporto fisico, la ECM fornisce anche una riserva di fattori macromolecolari, capaci di controllare la proliferazione, migrazione e differenziamento cellulari [Glukhova and Thiery, 1993; Holly et al., 2000]. Perciò, per ottenere un tessuto tridimensionale vitale a partire da costrutti 3D costituiti da ES e biomateriale, il materiale utilizzato dovrebbe agire non solo da supporto meccanico e guida geometrica, ma anche fornire una struttura adatta e una gamma ben-definita di segnali macromolecolari capaci di dirigere lo sviluppo de novo del tessuto. Comunque, a dispetto della sua importanza, esiste una scarsità di studi in letteratura focalizzati sul ruolo della struttura e della composizione del materiale di supporto nel differenziamento di cellule ES. Per chiarire la funzione della struttura e del tipo di materiale e la densità di domini di legami cellulari nel controllare il differenziamento di cellule ES, tali cellule sono state coltivate in gel polimerici semi-interpenetrati (semi-IPNs) composti da collagene di tipo I miscelato a fibronectina (FN) o laminina (LM), a diverse concentrazioni. In tal modo, è stato possibile modulare le proprietà fisiche e strutturali dello scaffold, semplicemente variando la concentrazione di collagene, mentre la natura e la densità dei domini di legame cellulari sono stati modulati facendo variare la composizione di FN o LM nel gel. In prima istanza, è stata

effettuata un'analisi della risposta cellulare, andando a valutare lo sviluppo e il differenziamento degli EBs. Successivamente si è passati alla caratterizzazione dei gel di collagene e dei semi-IPNs di collagene/FN e collagene/LM, al fine di determinare le proprietà strutturali, meccaniche e di trasporto di tali matrici. Per valutare la morfologia e la struttura delle matrici, sono state condotte analisi di immunofluorescenza indiretta, microscopia confocale (CLSM), elettronica a scansione ambientale (ESEM) e elettronica a trasmissione (TEM). La valutazione delle proprietà meccaniche dei gel e dei semi-IPNs è stata effettuata mediante misure reologiche. Infine, la tecnica FRAP è stata utilizzata allo scopo di determinare le proprietà di trasporto dei materiali, cioè la capacità di attraversamento di soluti e nutrienti.

MATERIALI E METODI

1 Materiali

Collagene isolato da derma bovino (Vitrogen, Angiotech Biomaterias, Corp., Palo Alto, CA) è stato preparato seguendo il protocollo standard. In breve, 8 ml di collagene, 1ml di PBS 10X, 1ml NaOH 0.1M sono miscelati insieme. Il pH della soluzione viene accuratamente portato a 7.4, pH al quale si verifica la fibrillogenesi del collagene. La soluzione di partenza presenta una concentrazione di 3.1 mg/ml. Il collagene utilizzato per questi studi ha una concentrazione finale pari a 1.2 e 2.4 mg/ml.

Le soluzioni di fibronectina plasmatica umana (1mg/mL) e laminina-1 (1mg/mL) sono invece fornite dalla Sigma.

2 Preparazione dei gel semi-interpenetrati (semi-IPN) di collagene - fibronectina e collagene -laminina

Per la preparazione dei semi-IPN, la fibrillogenesi del collagene è stata condotta in presenza di quantità variabili di fibronectina (FN) e laminina (LM). Le soluzioni di FN e LM sono state direttamente aggiunte alla soluzione di collagene ad una concentrazione finale di 10, 50, 100 µg/mL. Le soluzioni così ottenute sono state incubate per 1h a 37°C finché la fibrillogenesi del collagene non è stata completata e questo appariva come un gel idratato.

3 Sonda diffondente

Destrani fluorescentemente marcati, del peso molecolare di 500 kg/mol (Molecular Probe Inc. - Eugene, OR) sono stati utilizzati come sonde diffondenti per l'analisi FRAP. I campioni di collagene sono stati immersi in una soluzione di PBS (pH 7.4) contenente la sonda fluorescente (0.1 mg/ml).

4 Immunofluorescenza indiretta

Per le analisi della distribuzione di FN e LM nei semi-IPN di collagene, i campioni, preparati in chamber slides, sono stati fissati con paraformaldeide 4% per 20 min a RT, lavati due volte con PBS buffer e incubati con PBS-BSA 0.5% per bloccare i siti aspecifici. Gli anticorpi primari, mouse anti-collagen type I (Chemicon), mouse anti-FN (Sigma) and rabbit anti-LM (Sigma), diluiti in PBS-BSA 0.5%, sono stati incubati per 1h a RT. I campioni sono stati poi lavati tre volte con PBS-BSA 0.5% e incubati con gli anticorpi secondari anti-mouse fluoresceine-isothiocyanate (FITC) e anti-rabbit tetramethylrhodamine isothiocyanate (TRITC) (Chemicon), rispettivamente. Infine i campioni sono stati lavati con PBS.

Per l'immunofluorescenza per PECAM1, i campioni sono stati fissati per 10 minuti in paraformaldeide tamponata 4% e lavati con un tampone salino fosfatato (Phosphate-buffered saline, PBS) contenente 0.1% di Triton X-100 (PBST) (Sigma). La saturazione dei siti aspecifici è stata effettuata previa incubazione di 1 ora in una soluzione PBS con 10% di polvere di latte (Euroclone).

I campioni sono stati, quindi, incubati per 2 ore a temperatura ambiente con l'anticorpo primario policlonale di ratto PECAM-1 (Becton Dickinson) diluito 1:50 in una soluzione PBS con 10% di polvere di latte. I campioni sono stati lavati per tre volte in PBST (0.01% Triton) e incubati con l' anticorpo secondario anti rat-biotin (Becton Dickinson) diluito 1:150 in PBS con 10% di polvere di latte per 1 ora a temperatura ambiente. I campioni sono stati lavati per due volte in PBST (0.01% Triton) e una volta in un tampone legante avidina (150 mM NaCl, 20 mM Tris pH 8.5, PBS 1X), quindi, incubati in streptavidina fluorescente (Becton Dickinson) diluita 1:500 in tampone legante avidina per 25 minuti a temperatura ambiente al buio. Infine i campioni sono stati lavati nuovamente in PBST (0.01% Triton).

5 Microscopia confocale (CLSM)

Il microscopio confocale permette la visualizzazione e l'analisi di preparati fluorescenti di varia natura. Diversamente da quanto avviene in un microscopio tradizionale, in un microscopio a fluorescenza la sorgente luminosa è laser. La risoluzione è molto alta e le caratteristiche della luce risultante (estrema coerenza, alta intensità e lunghezza d'onda unica)

consentono di evitare i fenomeni di aberrazione e diffrazione tipiche della luce prodotta dalle lampade a incandescenza.

La luce del laser viene fatta convergere dalle lenti dell'obiettivo in un punto estremamente piccolo del campione osservato. Il punto stesso, attraverso un sistema di specchi oscillanti, viene spostato attraverso tutto il campo visivo dell'obiettivo, così da effettuare una scansione completa di tutto il piano focale. I campioni utilizzati per l'analisi devono essere marcati con un *probe* (o *dye*) fluorescente. Nella scelta del probe è necessario considerare vari fattori: le lunghezze d'onda di eccitazione ed emissione, le linee di laser disponibili, i filtri da utilizzare, ecc.. Il laser eccita i soli fluorocromi appartenenti al piano focale, corrispondenti al punto di massima concentrazione del raggio; in questo modo le sezioni non appartenenti al tale piano non vengono eccitate e il risultato complessivo è una riduzione degli aloni e del rumore di fondo.

Il principio di funzionamento di un microscopio confocale è illustrato in figura 1: la luce emessa dal laser viene deviata dallo specchio dicroico, investe il campione e lo eccita. I suoi fluorocromi emettono una radiazione luminosa che, catturata dalle lenti dell'obiettivo, colpisce nuovamente lo specchio dicroico, attraverso il quale la luce riflessa è deviata, mentre la luce fluorescente viene inviata prima al *pinhole* e poi ad un filtro, giungendo così al fotomoltiplicatore. Il pinhole funge da diaframma e impedisce che la luce proveniente dalle zone fuori fuoco raggiunga il fotomoltiplicatore. In questo modo solo il segnale luminoso relativo al piano focale contribuisce alla formazione dell'immagine finale. Il fotomoltiplicatore trasforma invece l'intensità luminosa rilevata in un segnale elettrico proporzionale all'intensità stessa. Tale segnale è poi elaborato via software, e viene così registrata l'intensità luminosa in ogni punto. I valori di intensità sono utilizzati per ricostruire l'immagine video: ogni punto del campione corrisponde ad un pixel, e l'intensità luminosa di ogni punto è rappresentata da un tono di rosso.

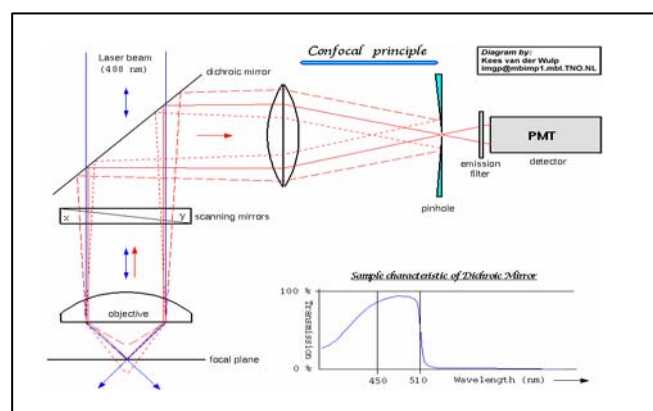


FIGURA 1. Principio di funzionamento del microscopio confocale

Variando la messa a fuoco, è possibile effettuare scansioni a piani focali variabili. Queste sono dette sezioni ottiche, e la loro unione consente di ricostruire un'immagine complessiva dell'intero volume (*acquisizione del volume*) (figura 2).

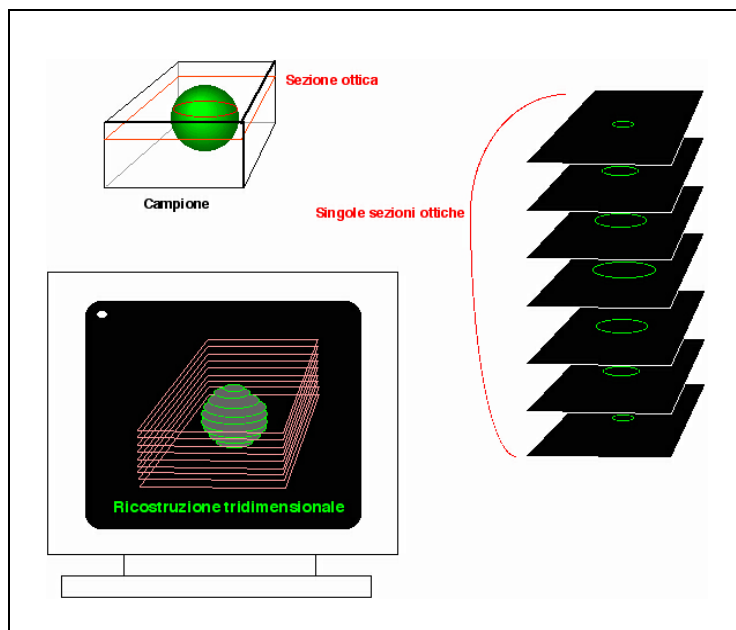


FIGURA 2. Sezioni ottiche e ricostruzione 3D di un'immagine al confocale

I campioni trattati per l'immunofluorescenza sono stati osservati al microscopio confocale (Zeiss, LSM 510) con un obiettivo $20 \times$ ad immersione in olio. Le immagini sono state acquisite mediante eccitazione con un laser ad Argon, alla lunghezza d'onda di 488 nm, ed un laser He-Ne, alla lunghezza d'onda di 543 nm. Per la rilevazione della FITC è stato utilizzato il filtro LP 505 e per la rodamina il filtro BP 560-600. La risoluzione delle immagini è 1024×1024 pixels.

6 Microscopia elettronica a scansione ambientale (ESEM)

Per la microscopia elettronica a scansione ambientale (ESEM), le matrici di collagene sono state fissate con 2.5% glutaraldeide e deidratate con la serie di etanoli crescenti (70%, 80%, 95% e 100%). I campioni sono stati poi analizzati mediante l'apparecchio ESEM Quanta 200 (FEI Company), in condizioni di vuoto non spinto (0.75 Torr), a 10 kV e una working distance di 7.7 mm.

7 Microscopia elettronica a trasmissione (TEM)

Per l'analisi strutturale, piccoli blocchi dei gel sono stati fissati per 60 min con 3% glutaraldeide contenente 0.05% di acido tannico tamponato con 0.1 M di buffer cacodilato, pH 7.4. I campioni sono stati poi lavati con 0.1 M di buffer cacodilato, post fissati per 60 minuti con OsO₄ in 0.1 M di buffer cacodilato, lavati di nuovo nel buffer e, poi, deidratati con la serie graduale di etanoli crescenti fino al 100%. I gel sono stati lavati con ossido di propilene al 100%, infiltrati e inclusi in resina epossidica.

Per la immuno-elettro-microscopia, piccoli blocchi del gel sono stati fissati per 60 min con glutaraldeide 0.1% in 0.1 M di buffer cacodilato, lavati abbondantemente col buffer e successivamente con Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM). I gel sono stati incubati poi con gli anticorpi Rabbit anti-laminin (Sigma L9393) o Mouse anti-fibronectin (Sigma F0791) diluiti 1:5 in DMEM overnight a 4°C, lavati abbondantemente con DMEM, poi immersi nell'appropriato anticorpo secondario coniugato ad 1 nm di oro (goat anti-mouse o anti-rabbit) (Amersham Biosciences) overnight a 4°C, lavati in PBS per parecchie ore, infine l'oro è stato evidenziato utilizzando il kit Nanoprobe gold enhancement. I campioni sono stati lavati di nuovo in SFM, fissati in 1.5% glutaraldeide/1.5% paraformaldeide contenente 0.05% acido tannico, poi post fissati in OsO₄ e, infine, disidratati e inclusi come precedentemente descritto. Per tutti i campioni, sono state contrastate sezioni ultrasottili di 60-80 nm in Uranil-Acetato e reattivo di Reynold citrato e osservati con un microscopio elettronico a trasmissione Philips EM 410LS.

8 Misure reologiche

Le proprietà reologiche dei gel di collagene e i semi-IPNs a base di collagene-FN e collagene-LM sono state valutate mediante test dinamico meccanici in oscillatorio, utilizzando un reometro rotazionale a stress controllato (GEMINI Bohlin instruments, Malvern UK), in una geometria a piatti paralleli (15 mm di diametro). Gli strumenti sono stati preriscaldati a $37 \pm 0.01^\circ\text{C}$ e mantenuti a temperatura costante durante il test. I gel sono stati preparati come descritto precedentemente e posti sul piatto riempiendo uno spazio di circa 1 mm. Per prevenire l'evaporazione del campione, le prove sono state condotte in ambiente umido. I moduli G' e G'' sono stati valutati come funzione della frequenza.

Test preliminari di "strain sweep" ad una frequenza di oscillazione fissa (che consistono nel monitorare le proprietà mentre l'ampiezza dello sforzo varia logicamente) sono stati condotti sui materiali per determinare la zona di viscoelasticità lineare [Ferry, 1970]. La

frequenza di oscillazione è stata variata da 0.1 a 1 Hz. I test sono stati ripetuti almeno quattro volte.

9 Misure del coefficiente di diffusione

I coefficienti di diffusione delle sonde sono stati misurati mediante Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP) [Peters et al., 1974; Edidin et al., 1976]. L'apparato sperimentale si compone di un microscopio a fluorescenza (AX60 Olympus), una lampada a mercurio (100 W; USH-02D Ushio), un laser monocromatico ad argon (488 nm; Innova 90-2) supportato di shutters e filtri spaziali (100 μm ; M900 Newport) per "spegnere" la fluorescenza e una CCD camera (PENTAMAX, Princeton Instruments). Il coefficiente di diffusione è stato valutato con un'Analisi di Frequenza Spaziale (SFA) [Berk et al., 1993; Tsay and Jacobson, 1991; Jain et al., 1990; Press et al., 1992]. Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando il software Metamorph (Universal Imaging Corp.) e i dati analizzati mediante un programma in Matlab (MathWorks, Inc.).

10 Cellule Staminali Embrionali

Per gli esperimenti sono state utilizzate cellule staminali embrionali (ES) di topo AB2.2 (Soriano et al., 1991). Le ES, nel loro stato indifferenziato, sono cresciute su un monostrato di fibroblasti embrionali di topo (SNL 76/7) inattivati con mitomicina D (Sigma). Le ES sono mantenute in terreno di coltura DMEM, addizionato con il 16% di siero fetale bovino (FCS; Hyclone), L-Glutamina 200 mM, 1000 U/ml Leukemia Inhibitory Factor (LIF; Chemicon), 5×10^{-5} M 2-mercaptoetanololo, e 1% di una miscela di penicillina (100 U/ml)-streptomicina (50 $\mu\text{g/ml}$) (Hyclone). Il mezzo di coltura viene cambiato quotidianamente e le cellule passate ogni 2 giorni.

11 Formazione dei corpi embrioidi (EBs) a partire da cellule staminali

Per il differenziamento delle cellule staminali embrionali è stato seguito il seguente procedimento: prima dell'induzione di un tipo di differenziamento, il monostrato di fibroblasti embrionali di topo viene eliminato attraverso due o tre passaggi delle ES in piastre Petri trattate con gelatina; durante questa fase il LIF viene aggiunto nel terreno di coltura per mantenere le cellule nello stato indifferenziato. Si procede alla formazione di corpi embrioidi seguendo il protocollo dell'"hanging drops". Le cellule ES vengono tripsinizzate, contate e risospese ad una densità di 50.000 cellule/ml (1000 cellule/20 λ) in terreno di coltura DMEM, addizionato con 15 % FBS (Stem Cell Technologies), L-glutamina (2mM), amminoacidi non

essenziali, 1% di una miscela di penicillina (100U/ml)-streptomicina (50µg/ml) in assenza di LIF. La sospensione cellulare viene piastrata in gocce di 20 λ sotto il coperchio di piastroni da 150 mm, contenenti circa 20 ml di PBS 1× necessari perché si crei una camera sufficientemente umida che impedisca l'evaporazione delle gocce. Le gocce vengono incubate per 48h a 37 °C in ambiente umidificato ed in presenza di una miscela di aria e CO₂ al 5%. Le gocce vengono trasferite in una piastra non aderente contenente DMEM addizionato con 20 % FBS (Stem Cell Technologies). I corpi embrioidi vengono cresciuti in questo terreno per i successivi 3 giorni prima di essere trasferiti in costrutti tridimensionali. Il terreno di coltura viene cambiato a giorni alterni.

12 DAPI (40,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride)

Per la rilevazione di nuclei apoptotici col DAPI, i campioni sono stati fissati in paraformaldeide 4% per 5 min a RT, lavati con PBS e permeabilizzati con TritonX100 0.1% per 10 min. I campioni sono stati incubati con una soluzione di DAPI (1 mg/ml in PBS) per 15 min a 37°C. I campioni sono stati lavati con PBS e osservati con un microscopio a fluorescenza (λ emission: 454 nm). Le immagini sono state acquisite con una fotocamera MICROMAX 5MHz (Princeton instruments).

13 Istochimica

I costrutti 3D di collagene e EBs sono stati fissati in formalina, inclusi in paraffina, sezionati e colorati con ematossilina-eosina, seguendo la procedura standard.

14 Determinazione del differenziamento cardiaco

EBs cresciuti in collagene in presenza di diverse quantità di LM sono stati osservati al microscopio a contrasto di fase e gli EBs battenti contati dopo 7 giorni di coltura. E' stato riportato il numero di EBs battenti su il numero totale di EBs.

RISULTATI

1 Analisi morfologica di EBs in gel di collagene.

Per verificare l'ipotesi che le proprietà meccaniche e la composizione del collagene possa influenzare lo sviluppo di un tessuto, EBs di 5gg sono stati cresciuti in costrutti di collagene con diversa composizione. Come prima analisi, è stato osservato e confrontato lo sviluppo

degli EBs cresciuti in gel di collagene al 2.4 e 1.2 mg/ml. Nei gel al 2.4 mg/ml di collagene, gli EBs mantengono la loro originale forma sferica, anche dopo 14-20 gg di coltura (figura 3 A). Al contrario, nel collagene 1.2 mg/ml, le cellule sono capaci di migrare dall'EB e originare nuove strutture (figura 3 B). Inoltre, EBs cavitati in collagene 1.2 mg/ml vanno incontro ad un aumento di cinque volte delle loro dimensioni originali (figura 3 C), in netto contrasto a ciò che accade agli EBs in collagene 2.4 mg/ml.

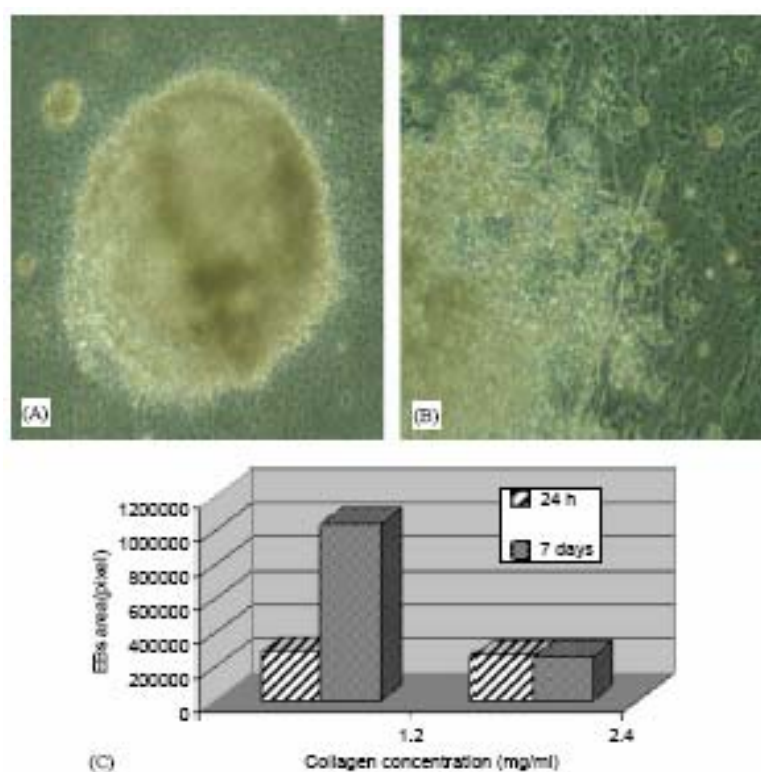


FIGURA 3. Valutazione della morfologia degli EBs col microscopio ottico, dopo 9 gg di coltura nello scaffold di collagene (A) 2.4 mg/ml e (B) 1.2 mg/ml. Original magnification, 20x. (C) Dipendenza della dimensione degli EBs sulla concentrazione di collagene a 1 e 7 gg.

2 Effetto delle proprietà fisiche e della composizione dello scaffold sulla cavitazione degli EBs.

Per chiarire meglio il ruolo delle proprietà fisiche del materiale sulla regolazione dello sviluppo e la formazione degli EBs in tessuti tridimensionali complessi, è stato osservato il processo di generazione della cavità proamniotica degli EBs coltivati nei gel di collagene a diversa composizione. E' stato osservato che in collagene 2.4 mg/ml, la cavitazione è inibita, mentre è facilmente rilevata nella maggior parte degli EBs cresciuti in collagene 1.2 mg/ml (dati non mostrati). L'analisi istologica conferma ulteriormente che in collagene 1.2 mg/ml gli EBs sviluppano una normale cavità centrale (figura 4 B), mentre a 2.4 mg/ml si osserva una massiccia area necrotica centrale (figura 4 A). Al fine di chiarire il meccanismo attraverso il quale le proprietà fisiche del materiale influenzano la formazione della cavità proamniotica e,

perciò, lo sviluppo dell'EB, è stato condotto un saggio di apoptosi. In breve, gli EBs sono stati colorati con il DAPI (40,6 diamidino-2-phenylindole dihydrochloride). Come mostrato in figura 6, l'apoptosi cellulare si osserva negli EBs coltivati in collagene 1.2 mg/ml (pannello B), mentre molto poche o quasi nessuna cellula apoptotica si osserva in collagene 2.4 mg/ml (pannello A). Questo indica che il collagene 2.4 mg/ml ostacola lo sviluppo naturale della cavità proamniotica inibendo l'apoptosi cellulare.

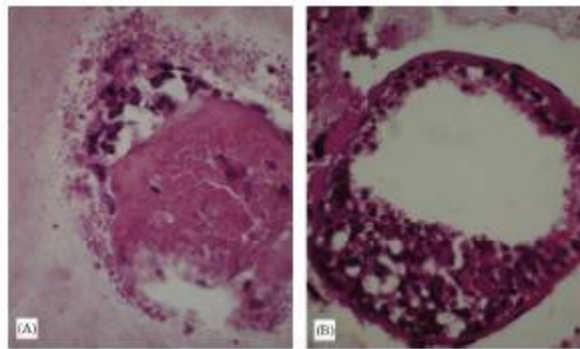


FIGURA 4. Analisi istochimica della cavitazione degli EBs, dopo 9 gg nello scaffold di collagene (A) 2.4 mg/ml e (B) 1.2 mg/ml. Colorazione con ematossilina/eosina. Original magnification, 20x.

3 Analisi strutturale dei gel di collagene 2.4 e 1.2 mg/ml.

Per verificare che la diversa concentrazione di collagene modificasse le proprietà strutturali e meccaniche del gel, sono state effettuate delle analisi all'ESEM. Il collagene 1.2 mg/ml appare con una struttura omogenea, con fibre dal diametro costante e molti spazi vuoti tra esse (figura 5 B). Al contrario, il collagene 2.4 mg/ml ha una struttura più compatta, con un numero minore di spazi vuoti nel network, e diametri variabili delle fibre di collagene (figura 5 A).

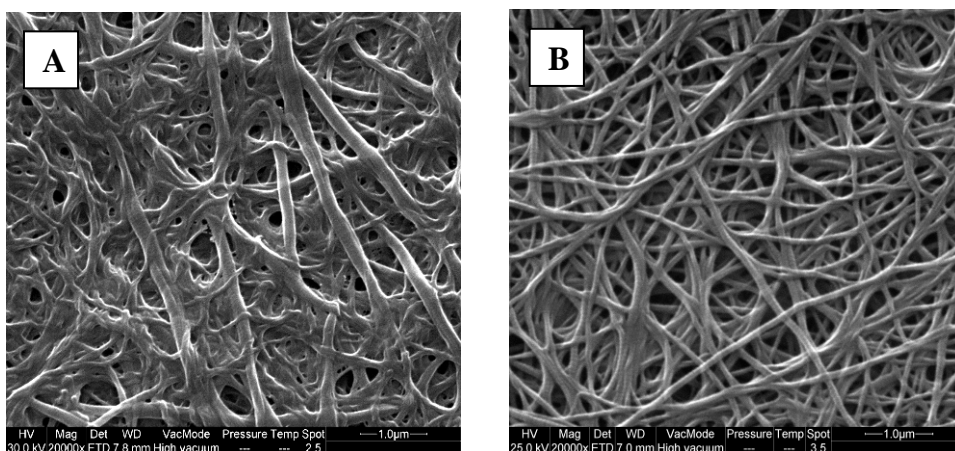


FIGURA 5. Micrografie ESEM di gel di collagene 2.4 mg/ml (A) e 1.2 mg/ml (B).

La formazione di una struttura più compatta e, quindi, di un gel più rigido è dimostrata anche dai valori del modulo elastico G' , il quale aumenta sensibilmente passando da una concentrazione di collagene 1.2 mg/ml, in cui G' è 16 Pa, ad una concentrazione di 2.4 mg/ml, in cui il valore di G' è 34 Pa.

4 Effetto di FN e LM sul differenziamento di EBs.

Per valutare il ruolo di segnali matricellulari sul controllo del meccanismo di sviluppo di EBs e sull'apoptosi cellulare, gli EBs sono stati coltivati in semi-IPNs di collagene-FN e collagene-LM. La presenza di LM influenza fortemente lo sviluppo degli EBs portando ad un drastico incremento della cavitazione (dati non mostrati) e un sensibile aumento dell'apoptosi (figura 6 D), confrontato al collagene puro. Al contrario, la presenza di FN non induce un aumento significativo dell'apoptosi rispetto al collagene da solo (figura 6 C).

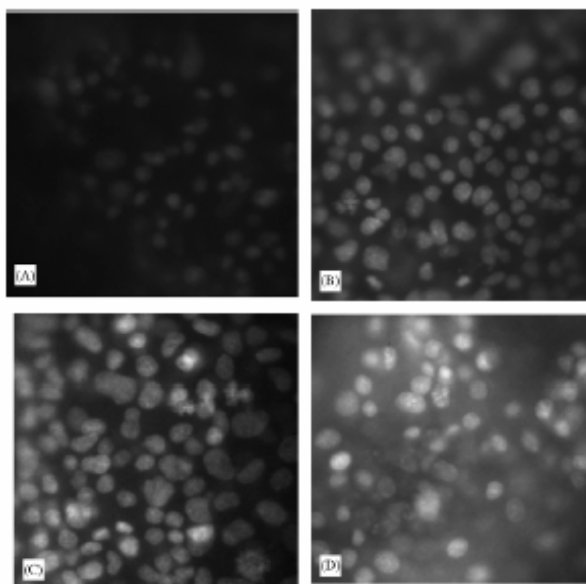


FIGURA 6. Valutazione dell'apoptosi negli EBs dopo 3 gg in scaffold di collagene e semi-IPNs. Colorazione con DAPI: (A) collagene 2.4 mg/ml; (B) collagene 1.2 mg/ml; (C) collagene 1.2 mg/ml + fibronectina 10 µg/ml; (D) collagene 1.2 mg/ml + laminina 10 µg/ml. Original magnification, 20x.

Gli EBs coltivati in costrutti 3D di collagene 1.2 mg/ml sono capaci di proliferare e crescere (figura 3 B). Per studiare il ruolo di fattori matricellulari nel controllare l'ulteriore sviluppo degli EBs e il loro "commitment" tessuto specifico, è stato valutato l'effetto della concentrazione di FN sul differenziamento degli EBs. Gli EBs sono stati risospesi in semi-IPNs di collagene-FN con diverse concentrazioni di FN. La concentrazione di collagene è stata fissata a 1.2 mg/ml, mentre quella di FN è stata fatta variare tra 5, 10, 50 e 100 µg/ml. La presenza di FN induce un aumento nella crescita degli EBs rispetto al solo collagene. Questo

aumento è dose dipendente. Alla concentrazione di FN di 100 $\mu\text{g/ml}$, è stata osservata la crescita di strutture dopo sole 24 h, mentre alla concentrazione di 5 $\mu\text{g/ml}$ di FN, la crescita inizia solo dopo 12 gg di coltura (figura 7). Inoltre, alte concentrazioni di FN inducono la formazione di strutture cave organizzate dopo 12 gg (figura 7 D e F).

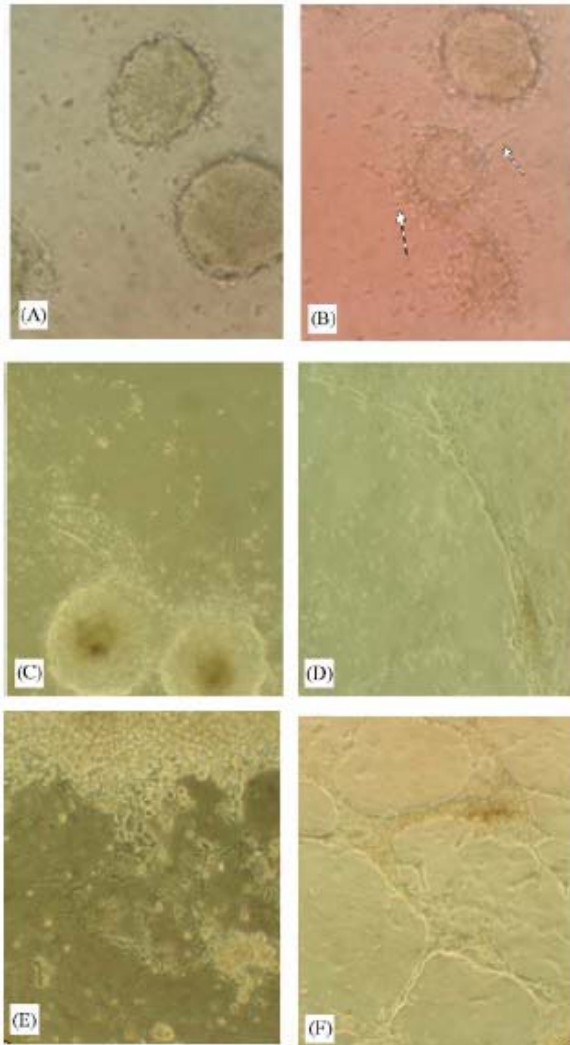


FIGURA 7. Valutazione al microscopio ottico della crescita di EBs in semi-IPNs di collagene-FN: (A, C, E) FN 5 $\mu\text{g/ml}$; (B, D, F) 100 $\mu\text{g/ml}$; (A, B) dopo un giorno di coltura nello scaffold; (C, D) dopo 12 gg; (E, F) 32 gg. Original magnification, 10x (A–D, F) and 20x (E).

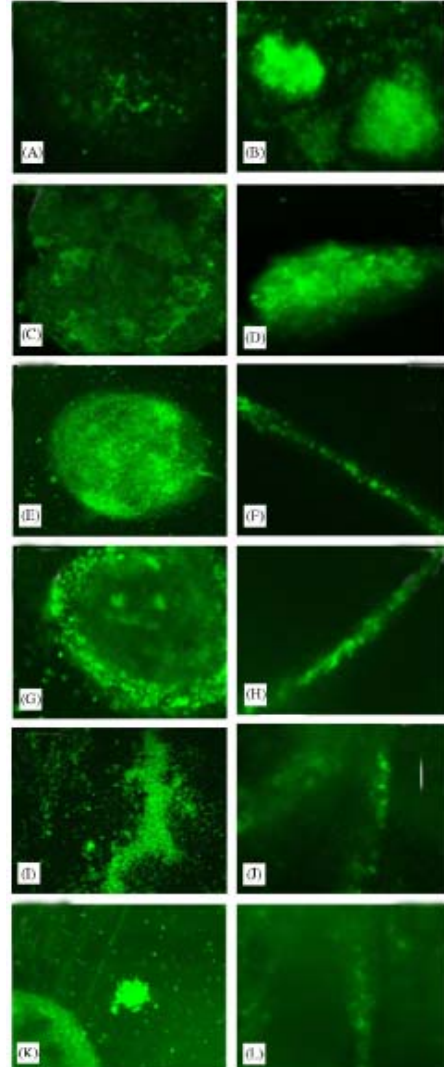


FIGURA 8. Immunofluorescenza per PECAM-1 di EBs cresciuti in semi-IPNs di collagene-FN. (A, B) gel di collagene 2.4 mg/ml; (C, D) gel di collagene 1.2 mg/ml; (E, F) semi-IPN di collagene 1.2 mg/ml + 10 $\mu\text{g/ml}$ FN; (G, H) semi-IPN di collagene 1.2 mg/ml + 100 $\mu\text{g/ml}$ FN; (I, J) semi-IPN di collagene 1.2 mg/ml + 10 $\mu\text{g/ml}$ LM; (K, L) semi-IPN di collagene 1.2 mg/ml + 100 $\mu\text{g/ml}$ LM. EBs cresciuti negli scaffold 3D per 9 gg (A, C, E, G, I, K) e per 24 gg (B, D, F, H, J, L). Original magnification, 20x.

Per verificare se le strutture cave osservate siano vasi, è stata effettuata un'immunofluorescenza utilizzando un anticorpo anti-PECAM1, specifico per il marker endoteliale CD31. Come mostrato in figura 8, dopo 9gg in collagene 2.4 mg/ml e 1.2 mg/ml,

si osserva solo un debole segnale di PECAM1 negli EBs (pannelli A e C). Al contrario, gli EBs coltivati in presenza di FN mostrano un segnale più intenso, spesso localizzato alla periferia del corpo embrioide (pannelli E e G). A 24 gg, il segnale di PECAM1 colocalizza con le strutture cave visualizzate con la microscopia ottica (pannelli F e H) ed è direttamente correlata alla concentrazione di FN. Viceversa, il numero di strutture tubulari PECAM-1 positive è notevolmente ridotto negli EBs coltivati in collagene senza FN (pannelli B e D). D'altro canto, la LM induce una debole differenziazione endoteliale (pannelli I-L). Le strutture cave formate nei semi-IPNs di collagene-FN mostrano di possedere un lume aperto, come indicato dall'analisi istochimica effettuata su sezioni seriali dei costrutti cellularizzati (figura 9). Questi dati indicano che la quantità di FN negli scaffold 3D gioca un ruolo importante nel "commitment" delle ES verso i vasi sanguigni.

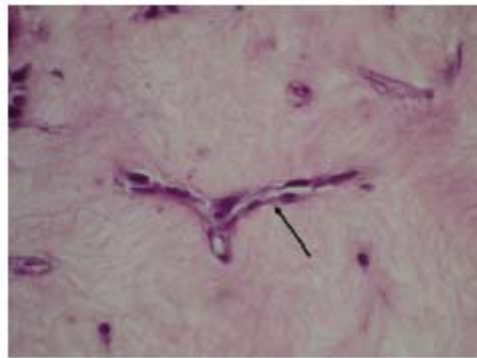


FIGURA 9. Analisi istologica degli EBs cresciuti in semi-IPNs di collagene-FN (concentrazione della FN pari a 100 $\mu\text{g/ml}$) per 21 giorni. Le frecce indicano una struttura cava. Original magnification, 40x.

Per dimostrare ulteriormente il ruolo svolto dai fattori della matrice sullo sviluppo e il differenziamento degli EBs, è stato studiato anche l'effetto della LM, coltivando gli EBs in semi-IPNs di collagene-LM, utilizzando diverse concentrazioni di LM. Per questi materiali, la composizione di collagene è mantenuta a 1.2 mg/ml, mentre la quantità di LM è fatta variare tra 1 e 100 $\mu\text{g/ml}$ (1, 5, 10, 50 e 100 $\mu\text{g/ml}$). E' stato osservato che l'aumento delle concentrazioni di LM porta ad un aumento del differenziamento cardiaco degli EBs, come indicato dal numero di EBs che hanno delle aree battenti (figura 10 A). In alcuni semi-IPNs di collagene-LM, si osserva, inoltre, che la contrazione del tessuto genera un flusso di cellule emopoietiche all'interno dell'EB (figura 10 B, sequenza di frame di un filmato). Questi risultati indicano che i segnali di adesione cellulare forniti dalla presenza di LM nello scaffold 3D guida lo sviluppo degli EBs verso la linea tessutale cardiaca.

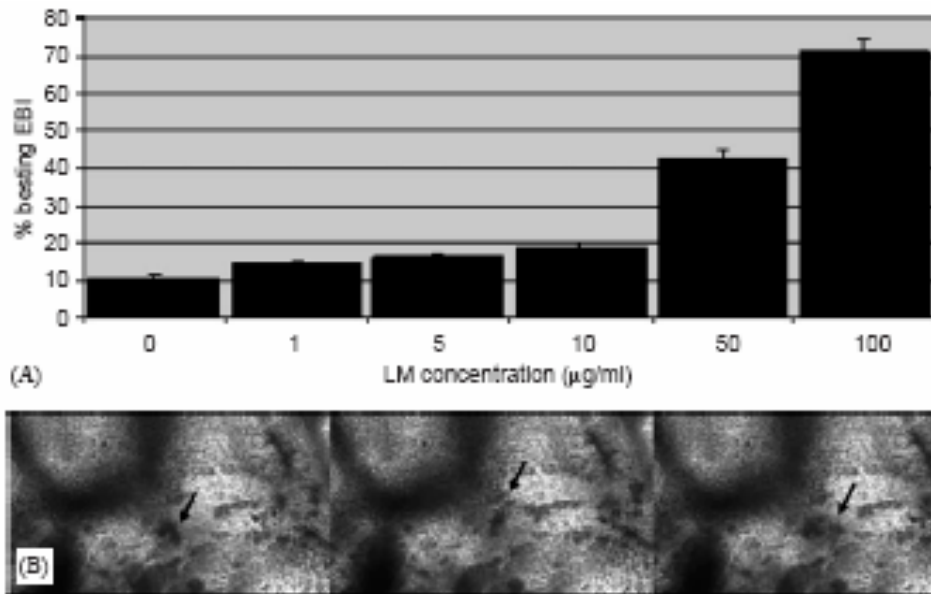


FIGURA 10. Differenziamento cardiaco in semi-IPNs di collagene-LM. (A) Grafico che mostra la percentuale di EBs battenti in funzione della concentrazione di LM nei semi-IPNs. (B) Sequenze di un filmato che mostra un EB battente in cui un flusso di cellule interne è pompato dalla contrattilità delle cellule cardiache. Le frecce indicano il cambiamento nella posizione delle cellule all'interno dell'EB. Original magnification, 10x.

5 Distribuzione di FN e LM in gel di collagene e in gel semi-interpenetrati (semi-IPNs) di collagene-FN e collagene-LM.

Allo scopo di investigare la struttura microscopica dei gel e dei semi-IPNs, è stata valutata la distribuzione spaziale di collagene, FN e LM nei gel mediante un'analisi di immunofluorescenza. Mentre il collagene è omogeneamente distribuito sia nei gel che nei semi-IPNs (figura 11 pannelli A-D e I-L), FN e LM risultano localizzate in spot discreti (figura 11 pannelli F-H e N-P). Gli spot appaiono eterogenei in forma e dimensioni e il loro numero aumenta all'aumentare della concentrazione di FN e LM. Inoltre, in presenza di LM, si possono osservare alcune sottili strutture fibrillari (figura 11 pannelli N-P). I pannelli di controllo sono riportati per evidenziare la specificità del segnale, infatti nessun segnale si osserva nei gel di collagene trattati con gli anticorpi anti-FN and anti-LM (figura 11 pannelli E e M). Questi risultati suggeriscono che le proteine LM e FN non si distribuiscono uniformemente nel gel e tendono ad aggregare in strutture macromolecolari.

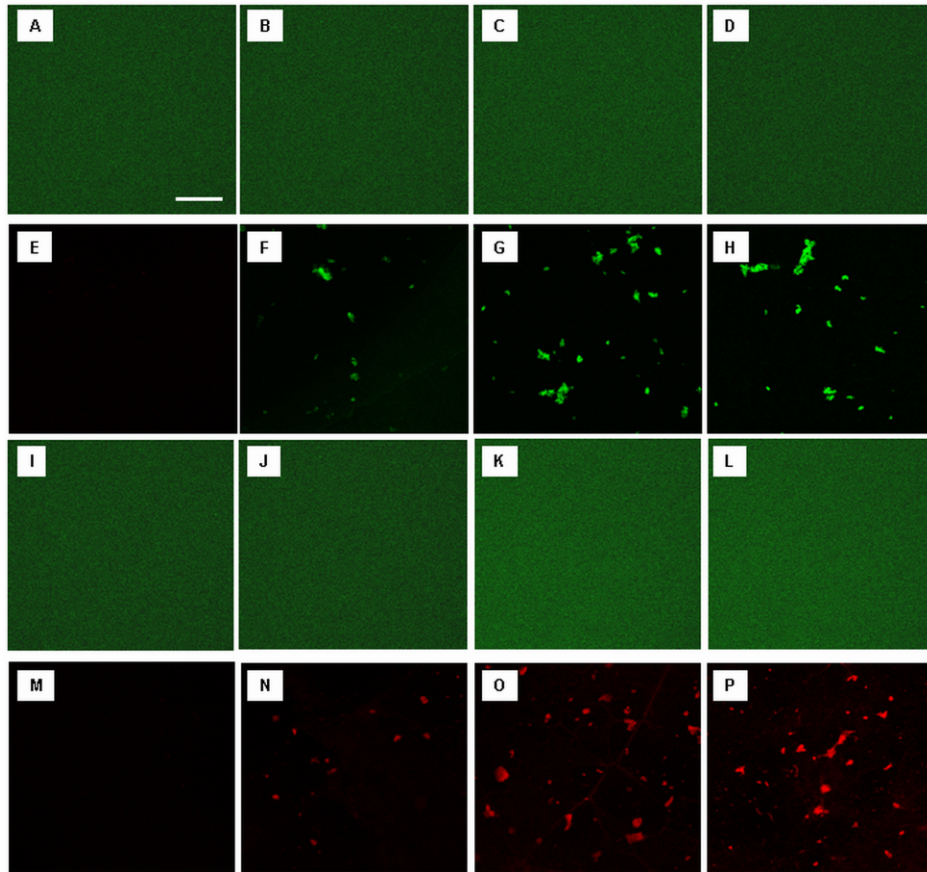


FIGURA 11. Immunofluorescenza indiretta di gel di collagene e semi-IPNs di collagene-FN e collagene-LM. A, E, I e M. gel di collagene 1.2 mg/ml; B e F. gel di collagene 1.2 mg/ml + 10 μ g/ml di FN; C e G. gel di collagene 1.2 mg/ml + 50 μ g/ml di FN; D e H. gel di collagene 1.2 mg/ml + 100 μ g/ml di FN; J e N. gel di collagene 1.2 mg/ml + 10 μ g/ml di LM; K e O. gel di collagene 1.2 mg/ml + 50 μ g/ml di LM; L e P. gel di collagene 1.2 mg/ml + 100 μ g/ml di LM. A, B, C, D, I, J, K, L sono stati trattati con anticorpo anti-collagene. E, F, G, H sono stati trattati con anticorpo anti-FN. M, N, O, P sono stati trattati con anticorpo anti-LM. (Bar 100 μ m).

6 Analisi morfologica dei gel di collagene e dei semi-IPNs di collagene-FN e collagene-LM.

6.1 ESEM

Per un'analisi più accurata della struttura del network di collagene nei gel e nei semi-IPNs, è stata effettuata un'analisi all'ESEM sui gel di collagene e sui semi-IPNs di collagene-FN e collagene-LM, facendo variare la concentrazione di FN e LM tra 10 e 100 μ g/ml. Le matrici di collagene presentano delle aree con maglie larghe del network (figura 12 A) e diametri delle fibre molto omogenei, approssimativamente di 100 nm (figura 13). Concentrazioni di FN di 10 e 50 μ g/ml non alterano sostanzialmente la struttura del network dei gel di collagene (figura 12 B e C). Al contrario, a concentrazioni di FN di 100 μ g/ml, la struttura dei gel appare più eterogenea, con alcune regioni amorfe e confini delle fibre meno definiti (figura 12 D). Inoltre, si riscontrano alcune zone dove del materiale amorfo è frapposto tra le fibre. Risultati simili si ottengono con i semi-IPNs di collagene-LM (figura 12 E-F-G).

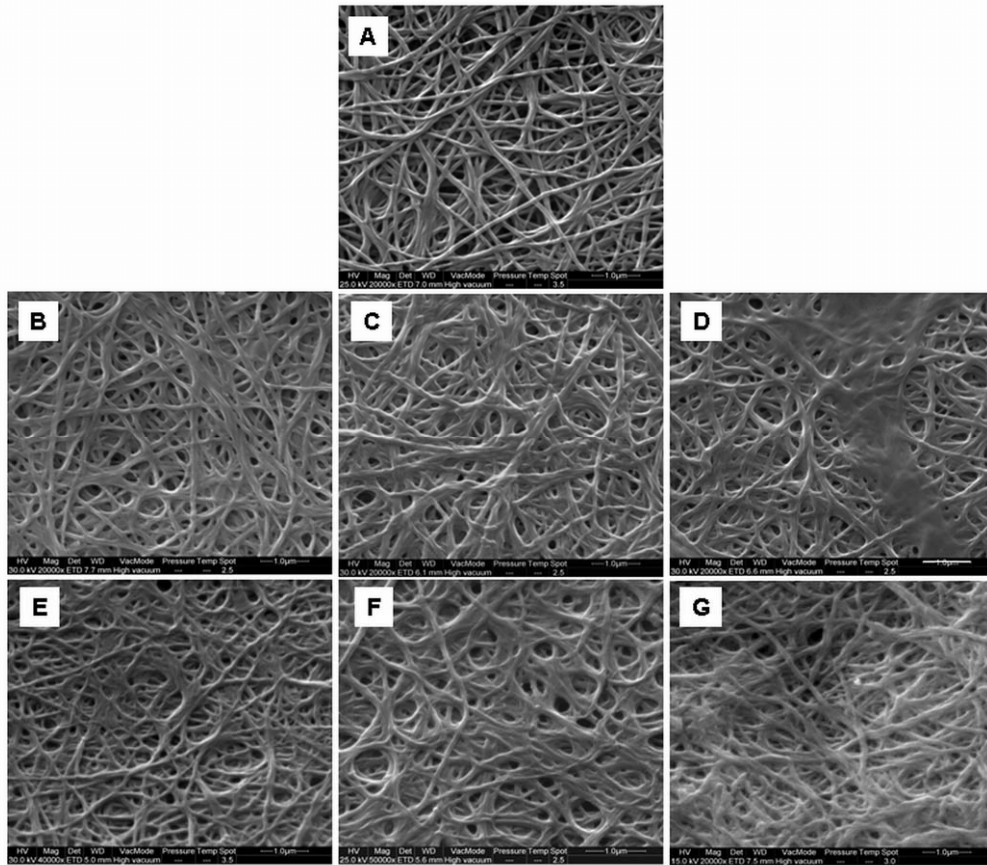


FIGURA 12. Micrografie ESEM di gel di collagene e semi-IPNs di collagene-FN e collagene-LM. A. gel di collagene 1.2 mg/ml; B. gel di collagene 1.2 mg/ml + 10 µg/ml di FN; C. gel di collagene 1.2 mg/ml + 50 µg/ml di FN; D. gel di collagene 1.2 mg/ml + 100 µg/ml di FN; E. gel di collagene 1.2 mg/ml + 10 µg/ml di LM; F. gel di collagene 1.2 mg/ml + 50 µg/ml di LM; G. gel di collagene 1.2 mg/ml + 100 µg/ml di LM. (Magnification × 20,000).

Anche per questi, infatti, solo le più alte concentrazioni di LM portano ad una modificazione della struttura del network.

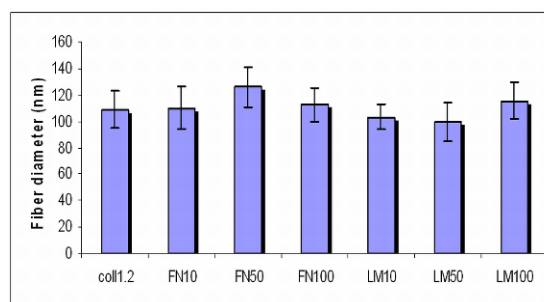


FIGURA 13. Diagramma del diametro delle fibre di collagene in gel di collagene e semi-IPNs di collagene-FN e collagene-LM.

6.2 TEM

Per ottenere maggiori informazioni sulla struttura delle singole fibre di collagene, è stata condotta un'analisi al TEM. Nei gel di collagene e nei semi-IPNs a basse concentrazioni di FN e LM, le sezioni trasversali delle fibre sono irregolari e appaiono essere prodotti di fusione

di segmenti fibrillari più piccoli (figura 14 A e C). Al contrario, l'aggiunta di quantità crescenti di FN e LM induce una modificazione nella struttura delle fibre di collagene, portando alla formazione di fibre lineari con un profilo circolare della sezione trasversale (figura 14 B, D e E). Inoltre, in presenza di FN e LM, si osservano sottili fibrille lungo le fibre di collagene (figura 14 B frecce).

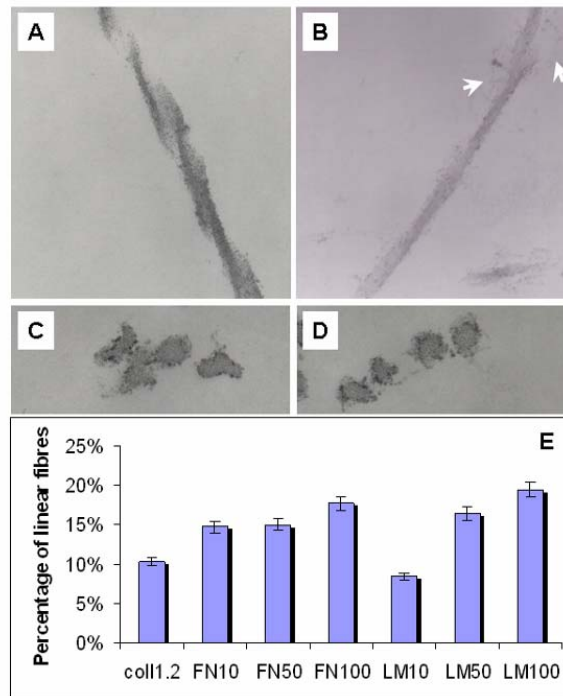


FIGURA 14. Micrografie TEM di gel di collagene e semi-IPNs di collagene-FN e collagene-LM. A. gel di collagene 1.2 mg/ml; B. gel di collagene 1.2 mg/ml + 100 µg/ml di LM; C. gel di collagene 1.2 mg/ml (sezione trasversale delle fibrille); D. gel di collagene 1.2 mg/ml + 100 µg/ml di LM (sezione trasversale delle fibrille); E. Dipendenza della forma delle fibre di collagene sulla composizione del gel (Barra 500 nm).

Il cambiamento della struttura della singola fibra di collagene, osservato, al TEM, può essere spiegato con quanto descritto in letteratura circa i modelli di accrescimento delle fibrille di collagene di tipo I [Birk et al., 1997]. Esistono, infatti, due modi con cui le fibrille di collagene possono crescere e diventare fibre mature (figura 15).

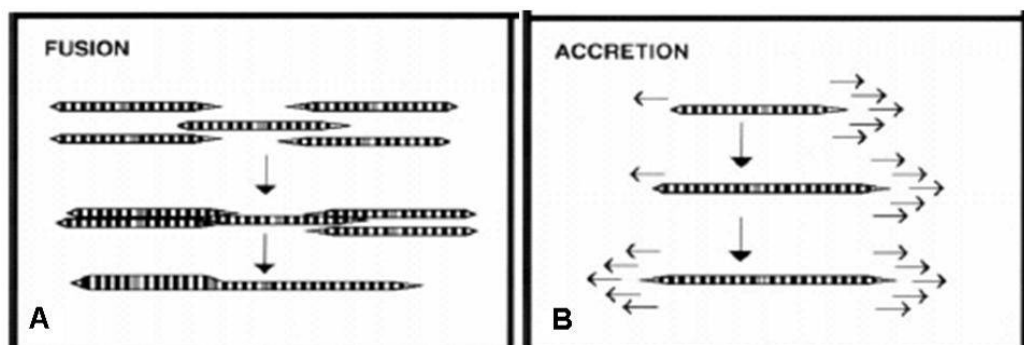


FIGURA 15. Modelli di crescita delle fibre di collagene [Birk et al., 1997].

Il primo modello, chiamato di fusione laterale, suppone l'associazione laterale di segmenti fibrillari più piccoli con conseguente fusione di tali segmenti per la generazione di una fibrilla più grande [Birk e Zyckband, 1993; Birk e Zyckband, 1995; Birk et al., 1995] (figura 15 A). Il secondo modello descrive, invece, una crescita lineare del segmento fibrillare dovuta ad un'aggiunta, alle estremità del segmento, di monomeri di collagene [Kadler et al., 1990; Romanic et al., 1992; Prockop e Hulmes, 1992] (figura 15 B). Sia in vivo che in vitro coesistono entrambi i modelli regolati da un sottile equilibrio. Tale equilibrio può essere influenzato dall'interazione del collagene con altre molecole, quali ad esempio i proteoglicani ricchi in leucina [Danielson et al., 1997; Chakravarti et al., 1998; Svensson et al., 1999] e i collagene non fibrillari, detti FACIT collagens [Shaw e Olsen, 1991; Dublet e Van der rest, 1987; Dublet e Van der rest, 1991; Keene et al., 1991; Walchli et al., 1994; Young et al., 2000]. E' stato dimostrato, ad esempio, che il collagene di tipo V favorisce la crescita lineare delle fibrille di collagene di tipo I a discapito di quella laterale [Birk, 2001].

Allo scopo di verificare se FN e LM fossero associate alle fibre di collagene, le sezioni al TEM sono state marcate mediante la tecnica dell'oro colloidale utilizzando anticorpi contro FN e LM (figura 16).

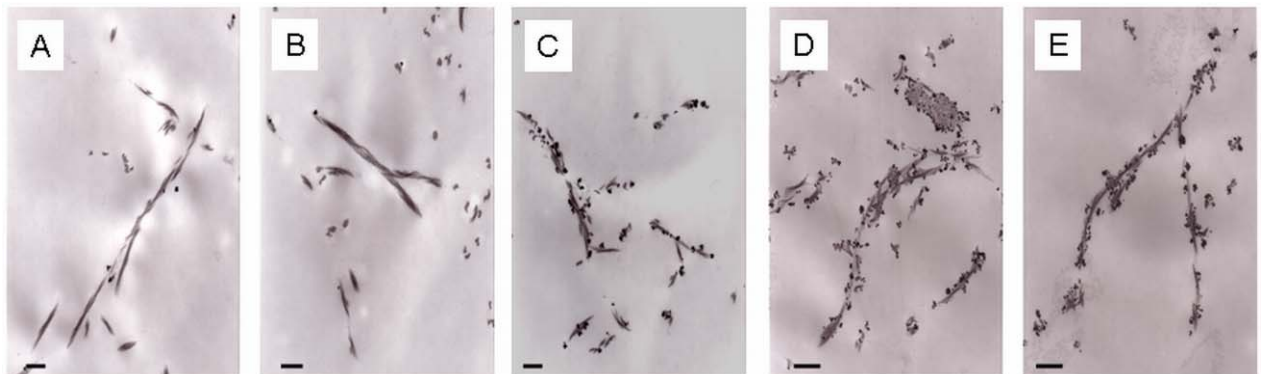


FIGURA 16. Marcatura con oro colloidale di FN e LM in gel di collagene e semi-IPNs di collagene-FN e collagene-LM. A. gel di collagene 1.2 mg/ml; B. gel di collagene 1.2 mg/ml + 50 µg/ml di FN; C. gel di collagene 1.2 mg/ml + 10 µg/ml di LM; D. gel di collagene 1.2 mg/ml + 50 µg/ml di LM; E. gel di collagene 1.2 mg/ml + 100 µg/ml di LM. I campioni sono stati trattati con anticorpo anti-FN. (Barra 500 nm)

Nei semi-IPNs di collagene-LM, la LM forma sottili fibrille lungo le fibre di collagene (figura 16 C, D e E). Inoltre, in accordo con i risultati di immunofluorescenza, l'anticorpo anti-LM si trova localizzato attorno a strutture amorfe, indicando, perciò, l'esistenza di aggregati discreti di LM all'interno della struttura 3D di collagene. Al contrario, nessun segnale si rileva nei controlli rappresentati dai gel di collagene puro e semi-IPN di collagene-FN trattati con l'anticorpo anti-LM (figura 16 A e B). La FN è distribuita similmente, localizzandosi lungo le fibre di collagene sotto forma di sottili fibrille (dati non mostrati).

7 Analisi reologiche dei gel di collagene e semi-IPNs di collagene-LM e -FN.

I risultati strutturali ottenuti indicano che alte concentrazioni di FN e LM alterano la struttura del collagene. Allo scopo di studiare se le modificazioni strutturali alterano le proprietà meccaniche dei semi-IPNs, sono state condotte delle prove reologiche. In figura 17 è mostrato lo spettro meccanico dei semi-IPNs collagene-LM e collagene-FN (50 $\mu\text{g/ml}$ di FN o LM), mentre nella tabella 1 sono riportati i valori di G' a (1 Hz) per i diversi campioni. Il comportamento reologico è tipico di un “gel debole”, con il valore del modulo elastico G' un ordine di grandezza maggiore di G'' e entrambi i moduli indipendenti dalla frequenza. Con l’aggiunta di LM o FN ai gel di collagene (figura 17) il comportamento reologico rimane qualitativamente simile, cioè il materiale continua a comportarsi come un gel debole, ma quantitativamente il valore del modulo G' cambia.

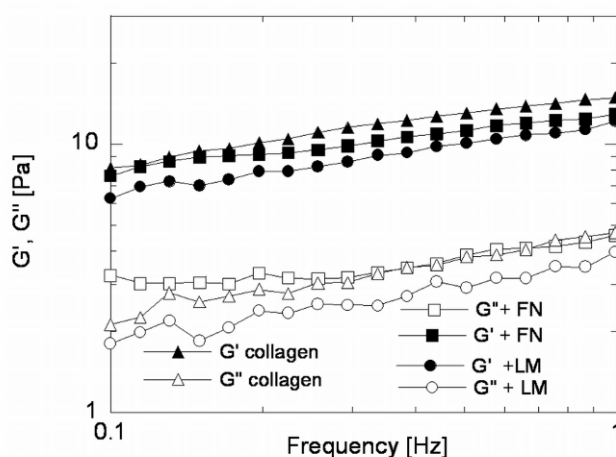


FIGURA 17. Valori dei moduli G' e G'' in funzione della frequenza per gel di collagene 1.2mg/ml e semi-IPNs di collagene-FN e collagene-LM 50 $\mu\text{g/ml}$ ($T=37^\circ\text{C}$).

Inoltre i semi-IPNs di collagene-LM e collagene-FN producono risposte simili al taglio: l’aggiunta di piccole quantità di LM o FN ($\leq 50 \mu\text{g/ml}$) non causa variazioni significative in entrambi i moduli, mentre grandi quantità ($\geq 100 \mu\text{g/ml}$) risultano in un sostanziale decremento dei moduli rispetto al gel di solo collagene. Infatti, G' ha un valore di circa 16 Pa per i gel a 10 $\mu\text{g/ml}$ di FN e LM come il controllo, mentre decresce fino a circa 5 Pa per i gel a 100 $\mu\text{g/ml}$ di FN e LM (tabella 1).

Amount of FN or LM [$\mu\text{g/ml}$]	G' gel with FN [Pa]	G' gel with LM [Pa]
0	16	16
10	16	14.7
50	12.9	12.1
100	5.4	5

Tabella 1. Valori del modulo elastico G' .

8 Analisi FRAP dei gel di collagene e dei semi-IPNs di collagene-FN e -LM.

Le proprietà di trasporto dei semi-IPNs sono state analizzate mediante la misura del coefficiente di diffusione del destrano (500 kg/mol), all'interno delle diverse matrici (figura 18). I risultati ottenuti indicano che la diffusività molecolare non è influenzata da basse concentrazioni di FN e LM. Al contrario, alle concentrazioni più alte (100 µg/ml), aumenta. L'effetto è maggiormente evidente per la FN. Il coefficiente di diffusione del destrano, infatti, incrementa da $9.65 \pm 0.13 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ nel collagene puro a $1.16 \pm 0.25 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ ad alte concentrazioni di LM e a $1.46 \pm 0.14 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ ad alte concentrazioni di FN.

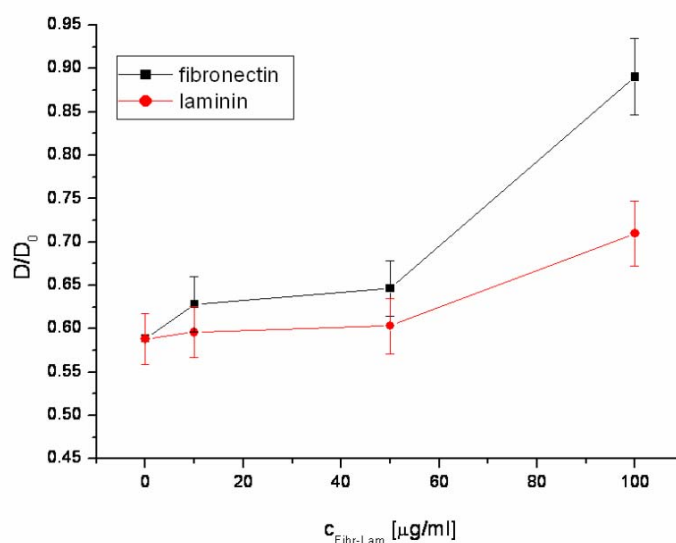


FIGURA 18. Coefficiente di diffusione del destrano (500 kg/mol) in semi-IPNs di collagene e fibronectina (quadrati) e collagene e laminina (cerchi), normalizzato rispetto al suo valore in acqua, rispetto alla concentrazione aggiunta.

DISCUSSIONE

L'utilizzo di cellule ES in combinazione con appropriati scaffold polimerici è un approccio promettente per l'ingegnerizzazione di tutti i tipi di tessuti 3D e, potenzialmente, organi per la terapia dei trapianti. Comunque, per vincere questa sfida, è strettamente necessaria la conoscenza dei fattori e dei meccanismi che occorrono per il controllo dello sviluppo e del differenziamento delle cellule ES in un ambiente 3D. In particolare è necessario capire il ruolo dell'interazione cellula-materiale sul differenziamento delle cellule ES e sull'abilità di dare origine a specifici tessuti 3D funzionali. E'ampiamente riconosciuto che i biomateriali usati come scaffold cellulari devono provvedere non solo ad un adeguato supporto fisico per l'orientazione e la proliferazione delle cellule, ma anche ai corretti segnali biologici per controllare e guidare le attività cellulari [Hubbell, 2003]. La progettazione di questi materiali

procede attraverso la comprensione delle funzioni biologiche degli specifici componenti della ECM, sia nello sviluppo che nel riparo tessutale. Infatti, in vivo, il differenziamento cellulare è, almeno in parte, controllato da un'interazione dinamica tra i componenti dell'ECM e le cellule [Glukhova et al., 1993].

L'ipotesi è che il differenziamento di cellule ES in costrutti 3D può essere modulato da segnali provenienti dallo scaffold stesso e che sia i fattori meccanici che biochimici giocano un ruolo importante, ancora distinto, nel differenziamento di cellule staminali.

I risultati presentati suggeriscono che le proprietà meccaniche e la composizione della matrice influenzano lo sviluppo e il differenziamento degli EBs. In particolare, la crescita, la cavitazione e il differenziamento degli EBs sono drasticamente inibiti quando il modulo elastico dello scaffold cresce da 16 a 34 Pa. La formazione della cavità proamniotica è uno step importante e propedeutico per lo sviluppo degli EBs e per la successiva generazione di tipi cellulari adulti [Coucouvanis and Martin, 1995]. La drastica inibizione della cavitazione degli EBs in collagene 2.4 mg/ml è probabilmente dovuta all'inibizione dell'apoptosi, come un risultato delle aumentate forze meccaniche agenti sugli EBs. Un solido effetto inibente sull'apoptosi è stato osservato in sferoidi [Helmlinger and Netti, 1997], suggerendo che l'inibizione dell'apoptosi può essere una risposta cellulare abbastanza generale all'incremento di forze meccaniche. Comunque, oltre alle forze meccaniche, il network fibrillare più denso dei gel di 2.4 mg/ml può rappresentare un impedimento alla crescita degli EBs. D'altro canto, i fattori molecolari forniti dalla matrice giocano anche un ruolo specifico nel guidare lo sviluppo degli EBs. Infatti, in presenza di concentrazioni di FN e LM che non inducono modificazioni meccaniche e strutturali della matrice rilevabili rispetto al collagene puro 1.2 mg/ml, il differenziamento degli EBs non risulta essere influenzato. Dove si osserva una riduzione di G' , dovuta ad una modificazione del processo di fibrillogenasi da parte delle concentrazioni di FN e LM di 100 $\mu\text{g/ml}$, l'effetto sul differenziamento appare essere anche più evidente: in queste condizioni, un effetto additivo di stimoli meccanici e biochimici può essere preso in considerazione.

Ancora, anche se FN e LM inducono la stessa organizzazione e le stesse proprietà meccaniche della matrice, il loro effetto sullo sviluppo e sul differenziamento degli EBs è altamente specifico: l'apoptosi cellulare e la cavitazione sono favoriti da un ambiente ricco di LM, ma non di FN. Inoltre, FN induce un differenziamento endoteliale dose-dipendente, mentre la LM stimola il differenziamento cardiaco. Presi insieme questi risultati, si può concludere che, modulando specifici segnali molecolari nello scaffold, è possibile indurre la cavitazione e guidare lo sviluppo degli EBs. Questo controllo è verosimilmente dovuto sia ai motivi di

adesione cellulare presenti su FN e LM sia alla distribuzione di tali segnali e alle proprietà meccaniche e alla struttura del materiale.

La maggior parte della letteratura riguardante l'induzione del differenziamento di EBs verso tessuti specifici è focalizzata sul ruolo di fattori solubili e agenti bioattivi [Hirashima et al., 1999; Balconi et al., 2000; Cachinidis et al., 2003]. E' stato dimostrato, ad esempio, che agenti come RA, TGF β , activina A o la combinazione di fattori angiogenici sono capaci di indirizzare il differenziamento di EBs verso linee cellulari specifiche in vitro [Hirashima et al., 1999; Balconi et al., 2000; Cachinidis et al., 2003], così come verso specifiche linee tessutali in scaffold polimerici 3D [Levenberg et al., 2003]. Contrariamente, ci sono pochissime informazioni sul ruolo di segnali non solubili sul controllo dei pathway differenziativi delle cellule ES. Ancora, i dati disponibili si riferiscono al ruolo della FN nell'indurre la crescita, la migrazione e l'organizzazione del citoscheletro cellulare [Sottile et al., 1998; Jiang et al., 1994; Bischoff, 1995; Stupack and Cheresh, 2002] in diversi sistemi cellulari. In particolare, la FN stimola la crescita e la proliferazione cellulare in maniera dose-dipendente [Sottile et al., 1998] e guida la migrazione cellulare attraverso il legame al suo recettore, l'integrina $\alpha 5\beta 1$ [Jiang et al., 1994]. In vivo, l'ECM ricca di FN è presente in tutti i processi di sviluppo tessutale, come il riparo, il rimodellamento e lo sviluppo embrionale [Glukhova et al., 1993] e, è stato dimostrato, che la FN e il suo recettore, l'integrina $\alpha 5\beta 1$, giocano un ruolo importante nel promuovere lo "switch" angiogenico [Jiang et al., 1994; Bischoff, 1995; Stupack and Cheresh, 2002]. Sulla stessa scia dei nostri risultati, Francis et al [Francis et al., 2002] hanno riportato che EBs $\alpha 5$ -null e FN-null sono entrambi incapaci di formare alcuna significativa vascolatura primitiva, mentre l'aggiunta di 100 $\mu\text{g/ml}$ di FN porta a un aumento del differenziamento endoteliale negli EBs FN-null, in presenza di fattori promuoventi il differenziamento endoteliale. Inoltre, i nostri dati mostrano che la FN aggiunta agli scaffold di collagene è capace di stimolare e dirigere gli EBs verso un differenziamento in strutture 3D simili a tessuti con la peculiarità di sviluppare vasi sanguigni, anche in assenza di fattori proangiogenici. Il ruolo della FN nel promuovere il differenziamento di cellule ES è stato anche riportato per EBs umani [Levenberg et al., 2003], dove scaffold di PLGA/PLLA hanno mostrato indurre livelli più alti di differenziamento endoteliale e vascolarizzazione, se precedentemente incubati con una soluzione di FN.

D'altro canto, il differenziamento cardiaco delle cellule ES è solitamente indotto dall'aggiunta di fattori solubili, quali il DMSO [Sachinidis et al., 2003]. Qui, è riportato che il pathway di differenziamento cardiaco può anche essere indotto da fattori matricellulari quale la LM. Questi risultati sono in accordo con il ruolo della LM nello sviluppo di tessuti in vivo. La LM

è una grossa glicoproteina immobilizzata nella ECM con provata influenza sull'adesione, migrazione, morfologia e differenziamento cellulare [Stupack and Cheresh, 2002]. E' capace di legare le integrine delle cellule muscolari lisce attraverso motivi non-RGD [Ruoslahti, 1991] e il suo effetto nello sviluppo del tessuto cardiaco è stato dimostrato in embrioni deficienti della LM-A, in cui il cuore è "rotto" come risultato della dissociazione delle cellule del pericardio [Yanitzky and Volk, 1995, Kuang et al., 1998]. Cellule ES mutanti per la delezione del gene della catena alfa 2 della LM differenziano normalmente in vitro, dando origine a cardiomiociti, miotubi e cellule muscolari lisce in aggiunta a molti altri tipi cellulari. Ciononostante, i miotubi formati sono instabili [Kuang et al., 1998]. Le nostre analisi di immunofluorescenza su semi-IPNs senza cellule, mostrano una distribuzione di entrambe LM e FN clusterizzata, invece che uniforme. Anche se si è osservato che LM e FN sono organizzate anche in sottili fibrille associate alle fibre di collagene, questa distribuzione a spot e le risposte biologiche generate negli EBs danno risalto al possibile ruolo della distribuzione del segnale in forma di aggregati nel generare una tale risposta cellulare. In altre parole, focalizzando l'attenzione sulla progettazione di un biomateriale, ci dovremmo chiedere se una distribuzione non omogenea di segnali debba essere la scelta d'elezione, piuttosto che una omogenea.

-CAPITOLO 5-
RISPOSTA CELLULARE A MATERIALI SINTETICI BIOATTIVI
EFFETTO DELLE PROPRIETA' MECCANICHE E
BIOCHIMICHE DEL SUBSTRATO SULL'ATTIVITA'
CELLULARE

INTRODUZIONE

Uno degli scopi principali dell'ingegneria dei tessuti è quello di progettare biomateriali capaci di guidare l'adesione e la migrazione cellulare da e verso lo scaffold al fine di promuovere l'invasione cellulare dello scaffold e la rigenerazione del tessuto. Sebbene i materiali naturali, che abbiamo considerato nel capitolo precedente, siano ottimali per favorire l'interazione cellula-materiale, poiché portano in sé i segnali riconoscibili dalle cellule, oggi si tende ad utilizzare materiali sintetici, non riconoscibili dalle cellule in modo specifico, ma facilmente modificabili. In tal modo, infatti, è possibile ingegnerizzare il materiale allo scopo di indirizzare la cellula secondo percorsi prestabiliti all'interno del materiale stesso, promuovendo così la rigenerazione del tessuto. L'utilizzo di materiali sintetici, inoltre, offre il vantaggio di modulare diverse proprietà del substrato e, quindi, di valutare la risposta cellulare ad una sola variabile. Per tale motivo, lo scopo di questo studio è stato analizzare l'influenza delle proprietà meccaniche e biochimiche del materiale sui processi di adesione e migrazione cellulare; in particolare, si è cercato di chiarire l'effetto della rigidità del substrato e della densità e distribuzione spaziale dei segnali biochimici sui parametri caratterizzanti l'adesione e la migrazione.

Come materiale si è scelto il poli-etilen-glicole (PEG), per le seguenti caratteristiche specifiche:

- risulta solubile in acqua;
- è commercialmente ottenibile con vari tipi e gradi di modificazioni chimiche (in particolare, nella sua forma acrilato derivata, può facilmente essere fotopolimerizzato ed eventualmente intrappolare, in modo semplice, biomolecole di dimensioni più o meno grandi);
- pur avendo bassa tossicità, è refrattario nei confronti delle proteine e sostanzialmente non adesivo per le cellule: ciò evita l'adsorbimento aspecifico di molecole, che possono interferire con il processo di adesione e che danno inconvenienti *in vivo*, come la formazione di trombi [VandeVondele et al., 2003];
- le sue caratteristiche di bassa tossicità e bassa immunogenicità lo rendono il candidato ideale per essere funzionalizzato e coniugato con diverse molecole bioattive, tra cui peptidi recanti segnali di adesione cellulare (es. RGD) e non solo [Hubbell, 1995; Fittkau et al., 2005].

Sono stati utilizzati tre diversi modelli sperimentali, mediante i quali è stato possibile variare le proprietà meccaniche e biochimiche del substrato di PEG.

Come primo modello sperimentale sono state realizzate superfici ricoperte di catene di PEG a

formare dei monostrati polimerici. Ci si è avvalsi della chimica dei *self assembled monolayers* (SAMs) [Mrksich, 2000; Mrksich et al., 1997; Mrksich et al., 1996], grazie alla quale è possibile legare covalentemente molecole tiolate, in maniera ordinata e con un'inclinazione specifica, su un substrato ricoperto d'oro (figura 1). Le molecole di PEG sono state modificate ad un'estremità con un gruppo -SH per favorire l'attacco all'oro mentre all'altra estremità è stato aggiunto il tripeptide RGD.

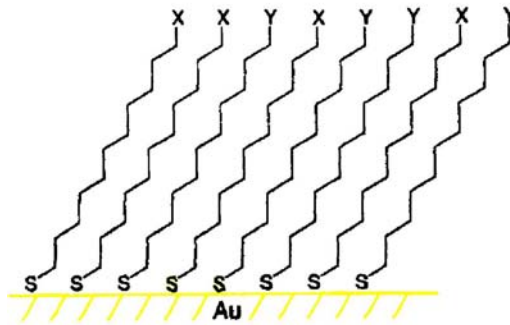
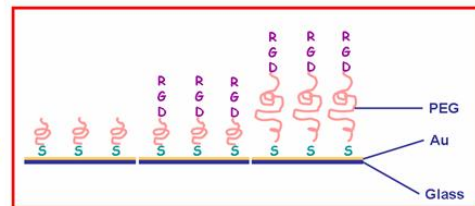


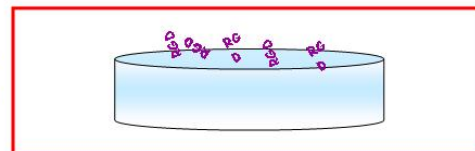
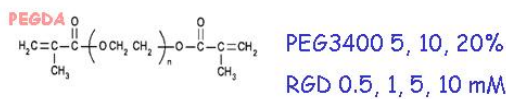
FIGURA 1. Self Assembled Monolayers (SAMs)

In questo modello sperimentale, il polimero è stato utilizzato come spaziatore tra il substrato di oro e il peptide RGD. La scelta di molecole di PEG di diverso peso molecolare, rispettivamente di 3400 e 6800 Da, ha permesso di modulare la lunghezza dello spaziatore (polimeri con peso molecolare maggiore hanno, evidentemente, una catena più lunga) con lo scopo di vedere se questo potesse influenzare l'adesione cellulare (figura 2).

•Monostrati (SAMs)



•Scaffold bioattivi (idrogeli)



•Scaffold con segnali direzionati (gradienti)

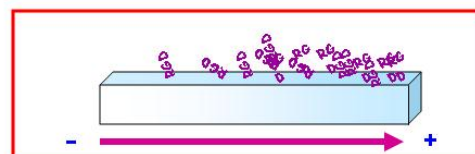
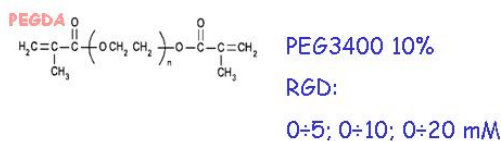


FIGURA 2. Modelli sperimentali

Il secondo modello ha previsto la realizzazione di idrogeli (figura 3) a base di PEGDA di 3400 Da, mediante la tecnica di fotopolimerizzazione UV.

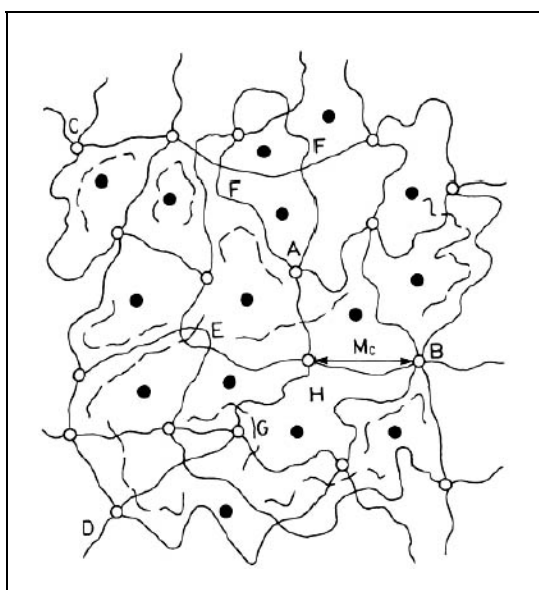


FIGURA 3. Struttura schematica di un idrogelo

Facendo variare la percentuale iniziale di PEGDA (5, 10, 20 e 40% in peso) nella soluzione precorritrice è stato possibile ottenere matrici con diversi gradi di rigidità. Con questo modello è stato possibile anche modulare le proprietà biochimiche, indipendentemente da quelle meccaniche, variando la concentrazione di RGD e non quella di polimero.

Il terzo e ultimo modello sperimentale ha permesso di valutare se le cellule fossero capaci di orientarsi “sentendo” i segnali di adesione distribuiti secondo una direzione specifica. A tale scopo, sono stati realizzati idrogeli di PEG con gradienti lineari di RGD.

Tutte le matrici sono state bioattivate legando covalentemente alle catene polimeriche [Massia et al., 1993; Massia e Hubbell, 1990] il peptide d'adesione RGD. E' noto, infatti, che il numero di cellule che aderiscono a substrati di questo tipo è maggiore [Hersel et al., 2003; Massia et al., 1993] rispetto alle matrici ove le molecole d'adesione sono legate con metodologie diverse, ad esempio l'adsorbimento [Keselowsky et al., 2004].

La scelta dell'RGD come fattore d'adesione, ha permesso di verificare come esso sia in grado di svolgere correttamente la funzione adesiva nei confronti delle cellule, in sostituzione dell'intera molecola di fibronectina.

Molti studi, infatti, hanno già dimostrato che l'RGD, come altri piccoli peptidi, viene riconosciuto dalle cellule [Burdick et al., 2004] e, dal punto di vista delle applicazioni biomediche, è senz'altro da preferire per varie ragioni: esibisce una migliore stabilità alle condizioni di sterilizzazione, ai trattamenti al calore e all'immagazzinamento, insieme ad una

più facile caratterizzazione ed efficienza sui costi. Inoltre, mentre le proteine della matrice extracellulare (ECM) contengono normalmente molti differenti “*motifs*” di riconoscimento cellulare, i piccoli peptidi, come l’RGD, contengono solo un “*motif*” di riconoscimento. Questi ultimi possono, quindi, indirizzare selettivamente un unico tipo di recettori di adesione cellulare.

La linea cellulare scelta è rappresentata da fibroblasti embrionali di topo, NIH 3T3: tali cellule possiedono la peculiare capacità di crescere adese alla superficie su cui vengono seminate. La risposta cellulare a tali substrati è stata valutata in termini di adesione, migrazione e proliferazione.

MATERIALI E METODI

1 Preparazione dei Self Assembled Monolayers di PEG (PEG-SAMs)

I Self assembled monolayers sono costituiti preferenzialmente da alcantioli, vale a dire lunghe catene carboniose che terminano ad un’estremità con un tiolo (-SH) e, all’altra, con un qualsiasi gruppo funzionale (-CH₃, -OH, -COOH, ecc.).

I SAMs si formano spontaneamente immergendo un substrato (in genere un vetrino coprioggetto), ricoperto da un sottile film d’oro (dello spessore di circa 15 nm), in una soluzione di alcantioli [Mrksich, 2000; Mrksich et al., 1997; Mrksich et al., 1996]. I monolayers che si ottengono risultano essere trasparenti, e compatibili, quindi, anche con analisi al microscopio ottico.

Nel seguente lavoro di tesi ci si è avvalsi della chimica semplice dei SAMs, per ottenere monostrati di catene di PEG bioattivate con il peptide RGD. Inoltre, facendo variare il peso molecolare del PEG, si è potuto creare superfici con catene polimeriche di diversa lunghezza e, quindi, diverse estensibilità della catena.

La procedura realizzativa è la seguente:

- Si preparano soluzioni acquose di (PEG3400)-SH, Ac-RGDC-(PEG3400)-SH e Ac-RGDC-(PEG3400)₂-SH in concentrazione 1 mM;
- Si aggiungono 10 µl/ml di una soluzione di TCEP (C₉H₁₅O₆P·HCl) in concentrazione 100 mM, al fine di limitare l’ossidazione dei tioli, fenomeno indesiderato in quanto ostacola la loro adesione all’oro;
- I vetrini, metallizzati con oro mediante “sputtering”, sono immersi nella soluzione;
- Incubati a temperatura ambiente per 24 h, i vetrini sono sottoposti a lavaggi con acqua bidistillata, per eliminare le molecole di PEG non adese alla superficie metallizzata, e

successivamente sterilizzati in soluzione di etanolo al 70% per 30 minuti.

2 Preparazione degli idrogeli di PEG diacrilato (PEGDA) bioattivati con RGD

La procedura di preparazione degli idrogeli è basata sulla fotopolimerizzazione, chiamata anche polimerizzazione fotoindotta. E' considerata una reazione radicalica in cui l'iniziazione è ottenuta con un meccanismo fotochimico; in tal modo, la soluzione liquida di monomero, esposta a luce visibile o a UV, viene convertita in polimero solido [Mellott et al., 2001]. Il grande vantaggio di tale tecnica consiste nella possibilità di ottenere un idrogelo *in situ*, semplicemente illuminando la soluzione acquosa di precursori in modo poco invasivo (ad es. con una lampada UV).

Poiché la maggior parte dei monomeri, oligomeri o prepolimeri, comunemente impiegati non producono specie iniziatrici quando esposti a raggi luminosi, è necessario utilizzare molecole organiche a basso peso molecolare, dette fotoiniziatori (PI), al fine di iniziare la polimerizzazione.

Il fotoiniziatore è sciolto nella soluzione di precursori, che viene convertita allo stato di idrogelo dall'esposizione ad una opportuna sorgente luminosa.

La fotopolimerizzazione avviene quando la soluzione di precursori, irradiata da luce di appropriata lunghezza d'onda, viene a contatto con il fotoiniziatore assorbito dal tessuto.

2.1 Protocollo di preparazione degli idrogeli

Il PEGDA(3400) (figura 4) viene dissolto in HEPES buffer 10mM, soluzione tampone pH 7.4 (Sigma), per formare soluzioni al 5%, 10%, 20% e 40% in peso di polimero (rispettivamente 0.05 g/ml, 0.1 g/ml, 0.2 g/ml e 0.4 g/ml).

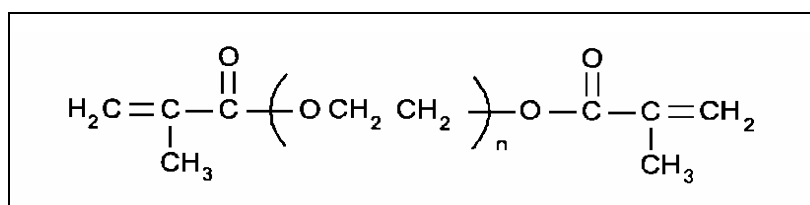


FIGURA 4. PEG diacrilato

Il fotoiniziatore, scelto, come in molti altri lavori di ricerca, per la bassa tossicità, è stato il DAROCUR1173 (2-hydroxy-2-metil-propiofenone) fornito dalla CIBA, utilizzato in concentrazione di 3% wt rispetto al peso di polimero. A questa soluzione si aggiunge acriloil-PEG-RGD (struttura costituita da una sequenza peptidica RGD coniugata ad un PEG

monoacrilato) in concentrazioni di 1 mM e 5 mM per ogni concentrazione di polimero (figura 5).

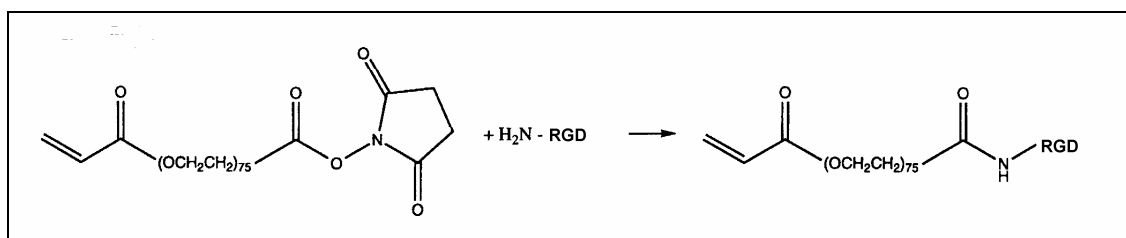


FIGURA 5. Formazione di Acriloil-PEG-RGD

La soluzione precorritrice viene, infine, posta in piastrine da 35 mm di diametro ed irradiata da raggi UV (365nm , $10\text{mW}/\text{cm}^2$) per 20 secondi, per attivare il fotoiniziatore e formare l'idrogelo (figura 6).

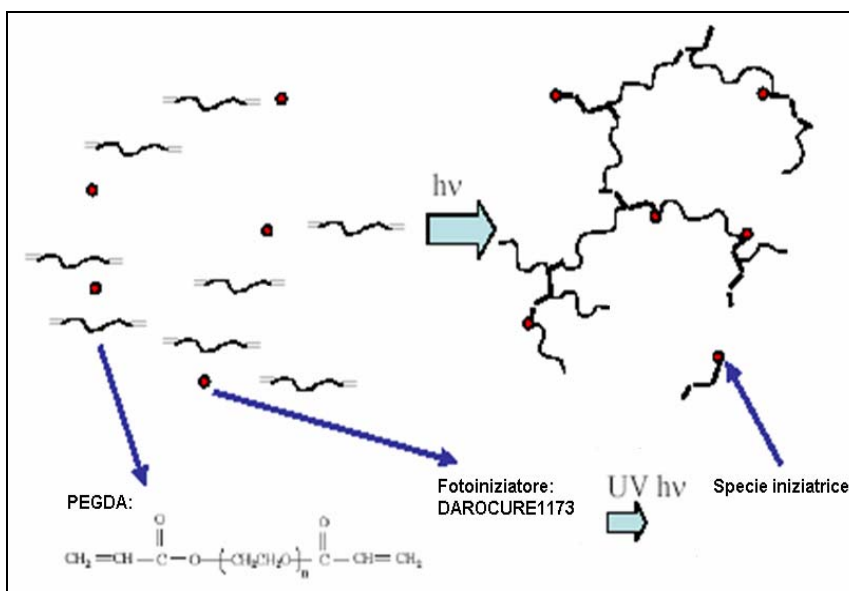


FIGURA 6. Formazione dell'idrogelo

3 Analisi FTIR-ATR

La spettroscopia IR è una tecnica analitica che si basa sull'interazione fra una radiazione elettromagnetica e la materia.

Più precisamente, si tratta di una spettroscopia di vibrazione; infatti, quando una molecola organica è investita da una radiazione infrarossa, la cui frequenza (espressa in termini di numeri d'onda, inversamente proporzionale alla lunghezza d'onda) sia compresa fra 10.000 e 100 cm^{-1} , l'energia ceduta dalla radiazione stessa viene convertita in energia vibrazionale.

Sono due i modi fondamentali in cui la molecola può vibrare:

- Vibrazione di *stretching*, dovuta a stiramento ritmico lungo l'asse di legame

- Vibrazione di *bending* (piegamento), dovuta a variazione dell'angolo di legame

Una vibrazione di stretching, quindi, è un movimento ritmico lungo l'asse di legame, con conseguente aumento e diminuzione della distanza interatomica.

Una vibrazione di bending, invece, può essere dovuta ad una variazione dell'angolo nei legami con un atomo in comune, oppure ad un movimento di un gruppo di atomi rispetto al resto della molecola, senza che si muovano gli atomi nel gruppo, uno rispetto all'altro.

In questo caso abbiamo:

- vibrazioni sul piano → *scissoring* e *rocking*
- vibrazioni fuori dal piano → *wagging* e *twisting*

Quando qualsiasi di queste vibrazioni determina una variazione del momento dipolare della molecola, allora si ha una vibrazione IR attiva.

Per esplicitare il concetto di vibrazione IR attiva o inattiva, facciamo riferimento ad una molecola di CO₂. Essa possiede un momento dipolare nullo, in quanto lo stiramento simmetrico dei legami carbonilici non porta ad assorbimento nell'IR: ogni momento dipolare associato ad un legame C=O è annullato, infatti, dall'altro. Lo stiramento asimmetrico comporta, invece, la comparsa di un momento dipolare variabile nel tempo, e cioè assorbimento (figura 7).

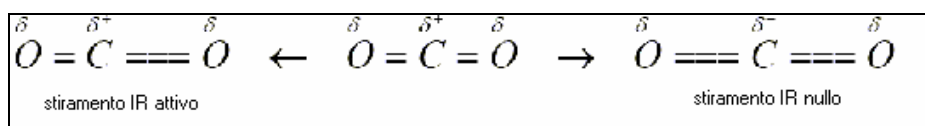


FIGURA 7. Esempio di vibrazioni IR attive e inattive

Maggiore è la variazione del momento dipolare, maggiore è l'assorbimento.

Lo spettro IR, ottenuto diagrammando l'intensità dell'assorbimento in funzione della lunghezza d'onda, sebbene sia riferito alla molecola nella sua interezza, è caratterizzato da dei picchi riferibili a gruppi funzionali specifici, facenti parte della sua struttura. È proprio grazie alla riproducibilità di questi picchi, e soprattutto dei valori caratteristici di assorbimento, che si può risalire alla struttura della molecola in esame.

3.1 Lo Spettrofotometro IR a Trasformata di Fourier (FTIR)

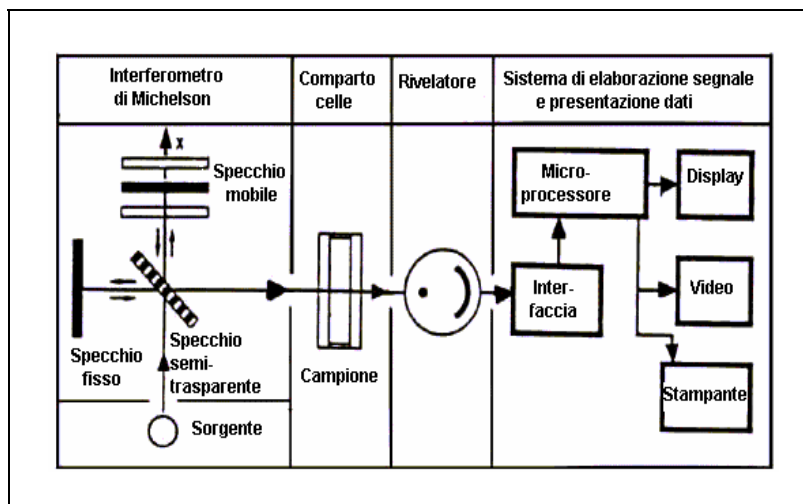


FIGURA 8. Schema di funzionamento dell'FTIR

Una sorgente luminosa ad incandescenza emette un raggio luminoso nel campo dell'IR; tale raggio giunge ad uno specchio semiriflettente (*beamsplitter*), che lo divide in 50% ad uno specchio fisso e 50% ad uno specchio mobile (figura 8).

I raggi riflessi da questi specchi sono inviati un'altra volta allo specchio semiriflettente, il quale li ricongiunge e li invia al *rivelatore*. Anche se i due raggi hanno raggiunto il rivelatore congiunti, essi hanno compiuto un diverso cammino ottico: ciò crea delle interferenze, costruttive o distruttive, che generano un segnale al rivelatore proporzionale alla differenza di cammino ottico dei due raggi e, quindi, alla posizione dello specchio mobile in quell'istante.

In base al movimento del suddetto specchio, tutte le radiazioni contenute nella luce emessa dalla lampada danno luogo ad un segnale complessivo di interferenza (*interferogramma*), che contiene in sé le informazioni riguardanti la frequenza e l'intensità della radiazione emessa.

La trasformata di Fourier, effettuata dal calcolatore dello strumento una volta che il raggio è arrivato al *detector*, mostra sullo schermo un tradizionale spettro infrarosso, trasformando il segnale di intensità luminosa in funzione del tempo (spostamento dello specchio) in segnale di intensità in funzione del numero d'onda.

Quando si desidera registrare lo spettro IR di una sostanza opaca, è possibile utilizzare una tecnica che non prevede l'attraversamento del campione da parte della radiazione. In questo caso vengono impiegati degli apparecchi il cui funzionamento è basato sul fenomeno della riflessione.

La tecnica maggiormente utilizzata è l'analisi in Riflettanza Totale Attenuata (ATR) (figura 9). La sostanza viene deposta al di sopra di un prisma, costituito da AgCl, un materiale ad elevato indice di rifrazione per tutte le radiazioni infrarosse.

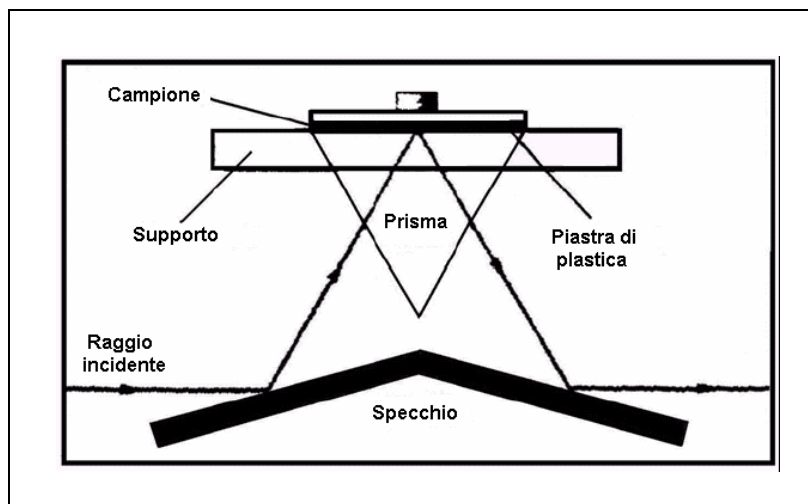


FIGURA 9. Analisi in ATR

Ad ogni riflessione il raggio penetra per qualche frazione di micron nella sostanza, venendone in piccola parte assorbito (o *attenuato*). Dopo alcune riflessioni, la diminuzione dell'intensità del raggio è sufficiente per essere rilevata dallo spettrofotometro, dando uno *spettro IR in Riflettanza Totale Attenuata (ATR)*.

3.2 Preparazione dei campioni per l'analisi ATR dei PEG-SAMs

I campioni, realizzati secondo la procedura sopra illustrata, sono stati separati dalla soluzione polimerica, sottoposti a lavaggi e posti per circa 1 h sotto cappa, al fine di eliminare l'acqua residua. Depositi in una Petri, sono stati collocati in frigo a 5 °C, per evitare possibili degradazioni del "coat" superficiale.

Tutte le analisi ATR-FTIR sono state condotte utilizzando lo spettrofotometro FTIR NEXUS.

3.3 Preparazione dei campioni per l'analisi ATR degli idrogeli

I campioni, costituiti da idrogeli di PEG3400 (10%) e di PEG3400 (10%) – RGD 5mM, e realizzati secondo il protocollo descritto precedentemente, sono stati parzialmente essiccati sottovuoto a 20 °C per 2h al fine di eliminare l'eccesso d'acqua, che avrebbe potuto inficiare il risultato dell'analisi, e conservati a temperatura ambiente. Si è fatto uso di una stufa VUOTEST (Mazzali Systems), ponendo ciascuno dei campioni tra due dischetti di TEFLON

(materiale antiadesivo e da essi, quindi, facilmente separabile), che hanno avuto la funzione di permettere ai gel disidratati di conservare la forma originaria.

4 Prove di adesione cellulare sugli idrogeli di PEG3400

I saggi di adesione cellulare sono stati condotti su idrogeli di PEG3400 al 5, 10, 20 e 40% wt, con diverse concentrazioni di RGD (0.5, 1 e 5 mM).

I diversi campioni vengono prodotti facendo particolare attenzione alle condizioni di sterilità. La soluzione precorritrice viene fatta fotopolimerizzare in multiwell da 48, per realizzare campioni cilindrici. Questi vengono poi spostati in multiwell da 24 e piastrati con cellule (fibroblasti di topo NIH-3T3), sospese in terreno DMEM al fine di ottenere una concentrazione superficiale di $5 \cdot 10^4$ cells/cm². Si fa esplicitamente notare che non si aggiunge nel mezzo di coltura il siero, il quale contiene diverse proteine di adesione e fattori di crescita che potrebbero inficiare il test di adesione. In questo modo, quindi, si è sicuri che l'eventuale adesione cellulare è da ricondurre esclusivamente al contributo del peptide di adesione RGD. I diversi campioni vengono, a questo punto, posti in incubatore a 37 °C con atmosfera controllata al 5% di CO₂.

Dopo 6h di incubazione si procede alla conta delle cellule aderite ai diversi campioni, realizzata attraverso la camera di Bürker. In realtà questa rilevazione è frutto di un controllo incrociato tra il numero di cellule che si trovano sul fondo del contenitore e in sospensione, che, per differenza dal numero di cellule totali piastrate, danno quelle che effettivamente hanno aderito al campione.

5 Osservazioni al microscopio ottico

Le osservazioni al microscopio ottico rovesciato OLYMPUS CK40 delle cellule seminate sui PEG-SAMs sono state realizzate dopo 5h dal piastramento, in presenza di terreno "povero" di siero (FBS 1%), e dopo 24h, in presenza di terreno "completo" (costituito, cioè da DMEM + 10% FBS).

6 Immunolocalizzazione dei contatti focali e delle fibre da stress di actina

Dopo 24h dal piastramento, le cellule sono state fissate per 20 minuti in paraformaldeide tamponata 4%, lavate con un tampone salino fosfatato (Phosphate- buffered saline, PBS) e permeabilizzate con PBS contenente 0.1% di Triton X-100 (Sigma). La saturazione dei siti aspecifici è stata effettuata con una soluzione di PBS con 0.5% di albumina sierica bovina (BSA) (Sigma).

Per la localizzazione della vinculina, i campioni sono stati incubati per 1 ora a temperatura ambiente in camera umida con l'anticorpo primario monoclonale di topo anti-vinculin (Sigma) diluito 1:200 in una soluzione di PBS-BSA 0.5%. I campioni sono stati lavati per tre volte in PBS-BSA 0.5% e incubati con l'anticorpo secondario anti mouse-FITC (Chemicon) diluito 1:50 in PBS-BSA 0.5% per 30 min a temperatura ambiente. Mentre per la localizzazione dei microfilamenti di actina, i campioni sono stati incubati con falloidina-rodaminata (Sigma) per 30 min a temperatura ambiente.

Infine, tutti i campioni sono stati lavati prima con PBS, poi con H₂Odd e montati su vetrini porta-oggetto con una soluzione di PBS-glicerolo (1:1).

I campioni trattati per l'immunofluorescenza sono stati osservati al microscopio confocale (Zeiss, LSM 510) con un obiettivo 40 × ad immersione in olio. Le immagini sono state acquisite mediante eccitazione con un laser ad Argon, alla lunghezza d'onda di 488 nm, ed un laser He-Ne, alla lunghezza d'onda di 543 nm. Per la rilevazione della FITC è stato utilizzato il filtro LP 505 e per la rodamina il filtro BP 560-600. La risoluzione delle immagini è 1024 × 1024 pixels.

7 Saggio di vitalità e proliferazione cellulare

Per stabilire la percentuale di proliferazione cellulare è stato usato l'Alamar Blue Assay (Biosource) [Fields and Lancaster, 1993]. L'Alamar Blue è solubile e stabile nel terreno di coltura e, non essendo tossico, permette un monitoraggio continuo delle cellule. Quando viene aggiunto al terreno di coltura, è captato dalle cellule nel loro citoplasma, ridotto dall'attività metabolica, molto intensa nelle cellule in fase di proliferazione, e restituito al medium.

Poiché la riduzione dell'Alamar Blue è accompagnata da significative variazioni di colore e di intensità di fluorescenza (si può passare dall'indaco non fluorescente al rosa fluorescente), tali parametri possono utilizzarsi come indici della vitalità cellulare.

Quantitativamente, la riduzione dell'Alamar Blue si ottiene misurando allo spettrofotometro l'assorbanza a due diverse lunghezze d'onda (λ): 570 nm (dove la forma ridotta assorbe maggiormente) e 600 nm (dove è massima l'assorbanza della forma ossidata). La lettura dell'assorbanza dei campioni è accompagnata dalla valutazione, alle stesse lunghezze d'onda, dell'assorbanza di un campione costituito dalla sola soluzione di Alamar Blue ("bianco") e/o di uno realizzato piastrando le cellule su una superficie di cui siano note le elevate proprietà adesive (es. vetro), da utilizzarsi come controllo positivo.

La riduzione dell'Alamar Blue è espressa, in genere, in forma percentuale sia rispetto al bianco che rispetto al controllo positivo. Le relazioni da utilizzarsi sono, rispettivamente, le seguenti:

$$\%reduced = \frac{(\varepsilon_{ox} \lambda_2) \cdot (A \lambda_1) - (\varepsilon_{ox} \lambda_1) \cdot (A \lambda_2)}{(\varepsilon_{red} \lambda_1) \cdot (A' \lambda_2) - (\varepsilon_{red} \lambda_2) \cdot (A' \lambda_1)} \cdot 100$$

$$\%reduced = \frac{(\varepsilon_{ox} \lambda_2) \cdot (A \lambda_1) - (\varepsilon_{ox} \lambda_1) \cdot (A \lambda_2)}{(\varepsilon_{ox} \lambda_2) \cdot (A'' \lambda_1) - (\varepsilon_{ox} \lambda_1) \cdot (A'' \lambda_2)} \cdot 100$$

ove:

$(\varepsilon_{red} \lambda_1)$ = 155.677 (coeff. di estinzione molare dell'Alamar Blue ridotto a 570 nm)

$(\varepsilon_{red} \lambda_2)$ = 14.652 (coeff. di estinzione molare dell'Alamar Blue ridotto a 600 nm)

$(\varepsilon_{ox} \lambda_1)$ = 80.586 (coeff. di estinzione molare dell'Alamar Blue ossidato a 570 nm)

$(\varepsilon_{ox} \lambda_2)$ = 117.216 (coeff. di estinzione molare dell'Alamar Blue ossidato a 600nm)

$(A \lambda_1)$ = Assorbanza del campione a 570 nm

$(A \lambda_2)$ = Assorbanza del campione a 600 nm

$(A' \lambda_1)$ = Assorbanza del bianco a 570 nm

$(A' \lambda_2)$ = Assorbanza del bianco a 600 nm

$(A'' \lambda_1)$ = Assorbanza del controllo positivo a 570 nm

$(A'' \lambda_2)$ = Assorbanza del controllo positivo a 600 nm

7.1 Descrizione del saggio

Le cellule NIH 3T3 vengono piastrate sui campioni e poste in incubatore ad atmosfera controllata (5% CO₂, umidità 95%). Il terreno di coltura aggiunto in questa prima fase è povero di siero, per fare in modo che l'adesione cellulare sia dovuta soltanto al peptide RGD, ove presente; dopo circa 4h si aspira il terreno povero e si aggiunge terreno completo. Dopo 24h si aspira nuovamente il terreno, si lava con PBS per eliminare le cellule che non hanno aderito, e si trasferisce ciascuno dei campioni, insieme ad un vetrino non metallizzato (controllo positivo) ed ad uno ricoperto con oro (controllo negativo), in un pozzetto di una multiwell da 24. Si prepara una soluzione con terreno completo al 10% v/v di Alamar Blue, e se ne pongono circa 500 µl su ogni campione; si pone anche la sola soluzione in un pozzetto vuoto: servirà come bianco. La multiwell è posta in incubatore per 4h, dopodiché si esegue una prima lettura allo spettrofotometro (Wallac 1421 serie VICTOR³, PERKIN ELMER); la stessa procedura si ripete dopo 48 e 72h.

8 Preparazione del gradiente di PEG-RGD

Il dispositivo utilizzato è quello di figura 10:

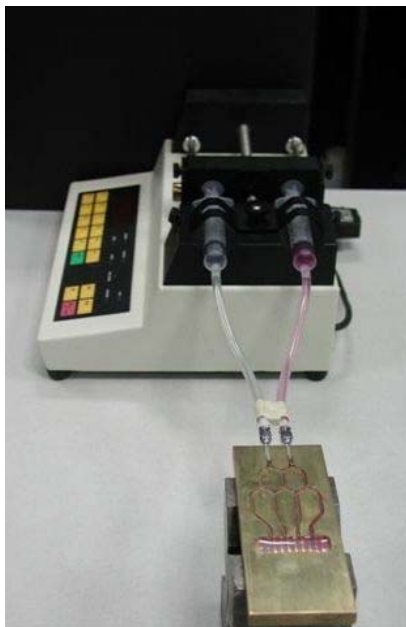


FIGURA 10. Dispositivo utilizzato per la realizzazione del gradiente.

Le due siringhe sono state in prima analisi caricate l'una con una soluzione al 10% wt di PEGDA 700 in HEPES buffer, e l'altra con la stessa soluzione arricchita da rodamina. Il flusso uscente dai tubi, collegati alla syringe pump, viene incanalato nel distributore di flusso in ottone (figura 11) in canali di sezione pari a 4 mm^2 . Impostando una portata di 0.2 mg/ml , si ottiene così un flusso che procede con moto laminare ad una velocità di 0.833 mm/s .

Le quattro correnti a diverse concentrazioni generano nella vasca di raccolta un gradiente nella direzione ortogonale al flusso. Dopo un tempo di riempimento pari a circa un minuto, la soluzione precorritrice viene esposta a raggi UV (365 nm , 3 mW/cm^2) per 20 s , così da attivare il fotoiniziatore e formare l'idrogel di figura 12.

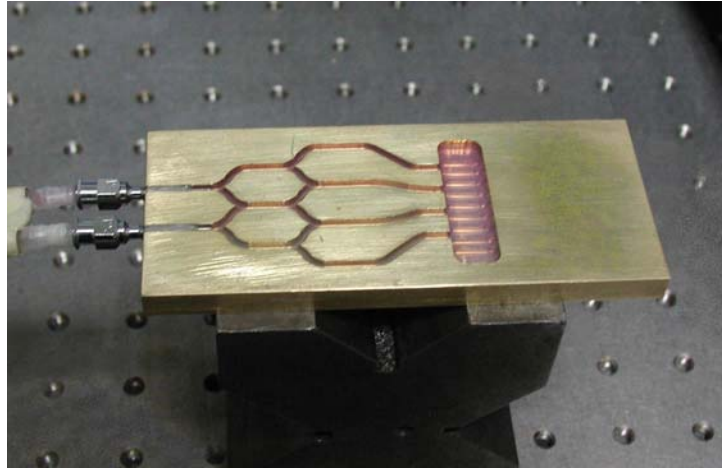


FIGURA 11. Distributore di flusso

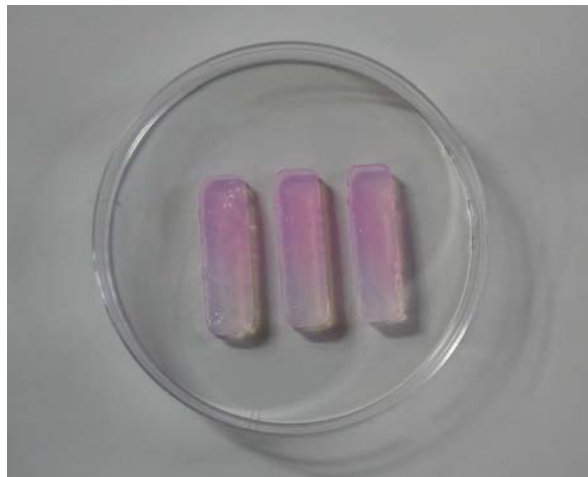


FIGURA 12. Idrogeli di PEGDA con gradiente di concentrazione

Il gradiente ottenuto con tale procedura è lineare come dimostrato in precedenza dall'analisi effettuata al microscopio confocale valutando la variazione dell'intensità di fluorescenza di un campione ottenuto utilizzando PEG-RGD fluorescinato (dati non mostrati).

9 Caratterizzazione del gradiente

Per poter mettere a punto l'apparato sperimentale ed arrivare alla caratterizzazione della distribuzione spaziale indotta nella matrice, sono stati osservati al microscopio confocale dapprima campioni ottenuti caricando le due siringhe, l'una con una soluzione al 10% wt di PEGDA 700 in HEPES buffer 10 mM, e l'altra con la stessa soluzione arricchita da 0.0034 mg/ml di rodamina ($C_{28}H_{30}N_2O_3 \cdot HCl$).

Le scansioni fatte hanno rivelato l'esistenza di un buon gradiente, senza bolle né disuniformità, lungo le direzioni x ed y (figura 13). Lungo l'asse z la concentrazione di

rodamina, che ha una densità più bassa della soluzione di PEGDA, diminuisce muovendoci lungo una stessa sezione dal pelo libero verso il basso.

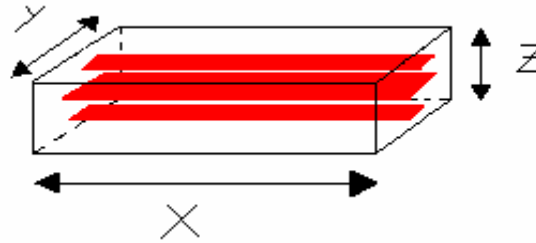


FIGURA 13. Rappresentazione 3D del campione di idrogel.

Le rilevazioni fatte lungo l'asse x, alla quota $z = 200 \mu\text{m}$ dal pelo libero del campione, evidenziano il gradiente di figura 14:



FIGURA 14. Gradiente a $z = 200 \mu\text{m}$.

Normalizzando ad ogni z i valori di intensità letti al confocale rispetto al valore di intensità massima, si ottiene il diagramma di figura 15, che mostra chiaramente la dipendenza del gradiente dalla quota.

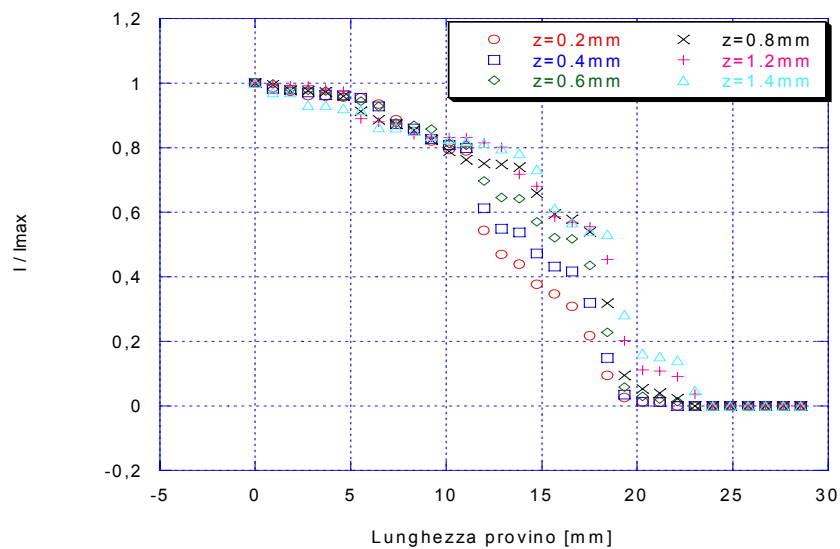


FIGURA 15. Profilo dell'intensità normalizzata lungo il campione.

Preparando dei campioni a diverse concentrazioni di rodamina in PEGDA e Hepes buffer 10 mM, e valutandone poi l'intensità al microscopio confocale, siamo pervenuti alla retta di taratura e al relativo diagramma normalizzato delle figure 16 e 17, attraverso i quali è possibile risalire al profilo di concentrazione lungo il campione a partire dai valori di intensità. Escludendo i due plateau a concentrazione costante, corrispondenti alle zone comprese tra gli sbocchi laterali e la parete della vasca di raccolta, si ottiene il diagramma di figura 18, in cui si evince che il gradiente è lineare, pressochè descritto sempre dalla stessa equazione, ma dipendente dalla quota z.

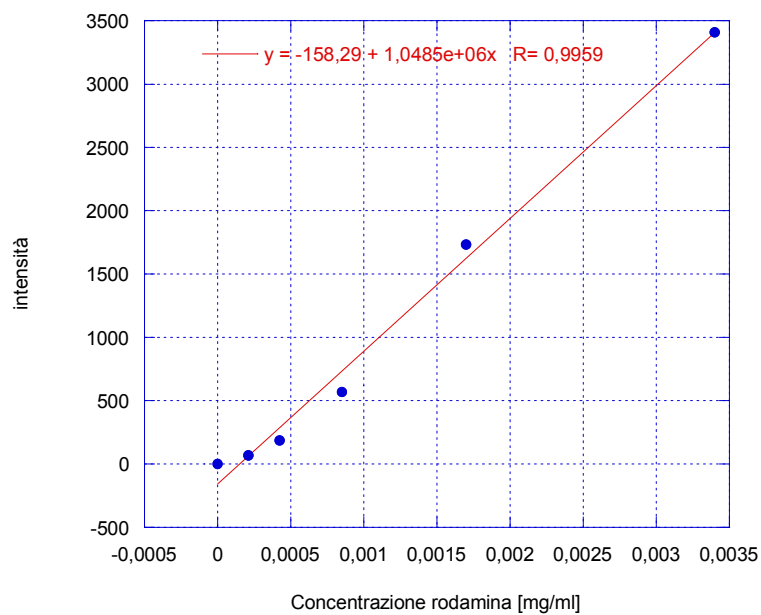


FIGURA 16. Retta di taratura.

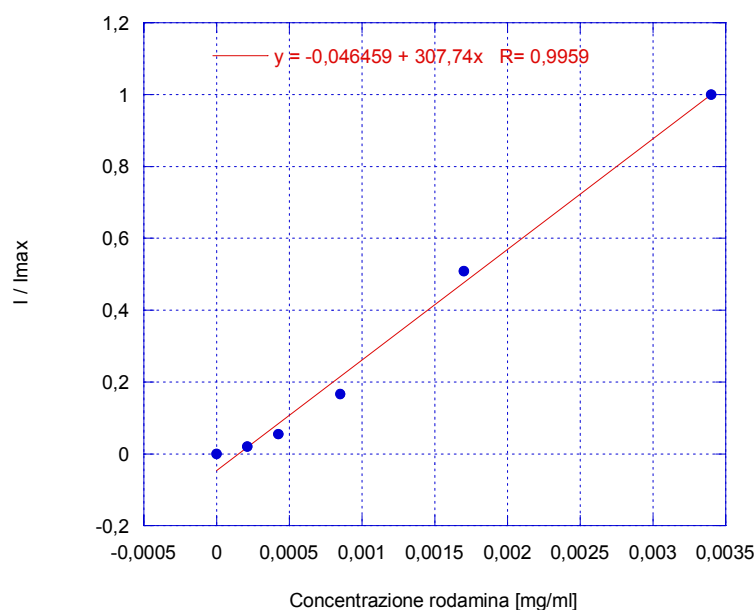


FIGURA 17. Retta di taratura normalizzata.

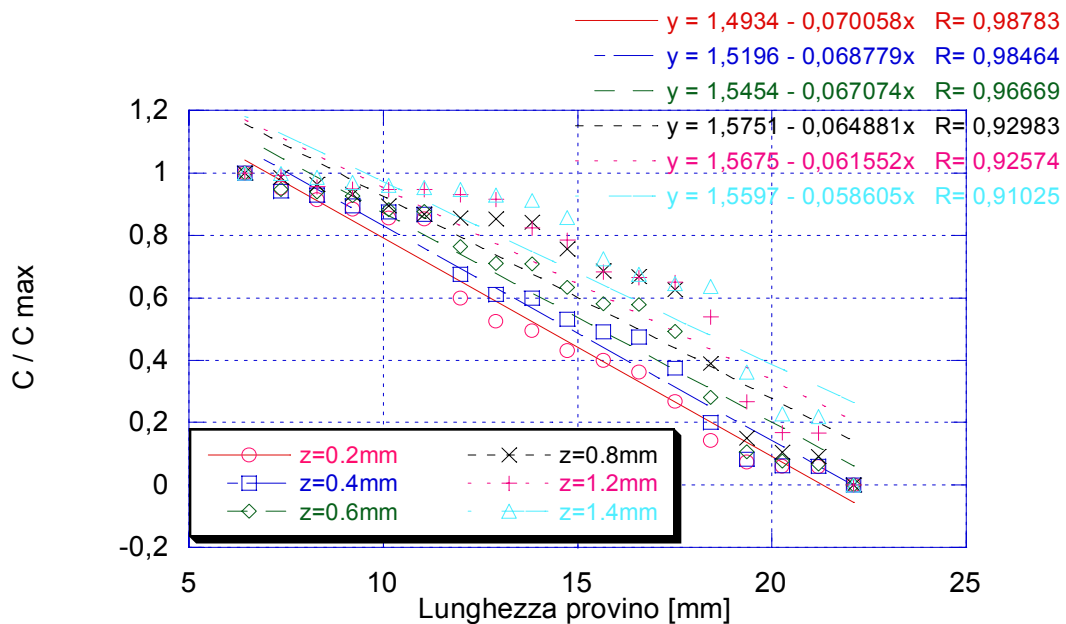


FIGURA 18. Profilo della concentrazione normalizzata lungo il campione.

10 Esperimenti di migrazione cellulare

Per determinare i parametri caratterizzanti la migrazione cellulare è stata messa a punto una tecnica sperimentale, che consente di seguire le cellule e di ricostruire a ritroso il percorso compiuto in un fissato intervallo. Grazie a tale tecnica si può determinare sperimentalmente la distanza tra un'immagine e l'altra e, a partire da tale valore, possibile valutare i parametri S e P.

10.1 Modello interpretativo

La forma fondamentale della migrazione cellulare osservata in vitro può essere descritta come *persistent random walk* [Stokes et al., 1991], motilità casuale. Secondo tale modello, per brevi periodi di tempo (*short time*) la cellula si muove lungo un percorso quasi rettilineo, mentre per lunghi periodi (*long time*) il movimento delle cellule è simile a moti Browniani, caratterizzato da molti cambiamenti nella direzione.

“Short” e “Long” time non sono valori assoluti, ma sono legati ad una caratteristica del movimento nota come persistence time, indicata in letteratura con la lettera P [Stokes et al., 1991]. Linderman ha dato un'interpretazione molto intuitiva di tale parametro caratterizzante la migrazione, definendolo semplicemente come il tempo medio durante il quale la cellula

non subisce significativi cambiamenti nella direzione del moto. Il valore di P varia secondo il tipo di cellula e, a parità di cellula, con la struttura del materiale.

Un altro parametro che caratterizza la migrazione cellulare è la velocità S, *cell speed* (distanza/tempo).

Per determinare questi parametri, è necessario conoscere lo spostamento medio D, *cell displacement*, che le cellule percorrono in un intervallo t. La conoscenza sperimentale di D consente di ricavare i valori di S e P, utilizzando un modello matematico in cui sono correlate le tre grandezze.

Il modello utilizzato è quello di Stokes-Lauffenburger (*random walk model*) [Ware et al., 1998; Lauffenburger and Linderman, 1992; Lauffenburger, 1991; Stokes et al., 1991], che permette di determinare la radice quadrata di S e la P (persistence time) a partire dalla posizione, (x,y,z), del centro o centroide della cellula. Nell'equazione sono messi in relazione il quadrato della velocità con la media del quadrato del cell displacement, $\langle D^2 \rangle$, nelle n dimensioni in cui le cellule migrano e durante un intervallo t:

$$\langle D^2 \rangle = n \cdot S^2 \cdot \left[P \cdot t - P^2 \cdot \left(1 - \exp\left(-\frac{t}{P}\right) \right) \right] \quad (1)$$

Per lunghi intervalli di tempo tali che $t \gg P$, l'equazione si semplifica nella seguente espressione:

$$\langle D^2 \rangle = n \cdot S^2 \cdot P \cdot t \quad (2)$$

Questo caso limite mostra un comportamento tipico della diffusione pura. Infatti, tenendo conto che dalla combinazione di S e P si definisce il *random motility coefficient*, μ :

$$\mu = \frac{1}{2} \cdot S^2 \cdot P,$$

che è l'effettiva "diffusione" delle cellule rispetto lunghi intervalli di tempo, la $\langle D^2 \rangle$ risulta essere linearmente proporzionale all'intervallo di tempo, con tale coefficiente che risulta essere la costante di proporzionalità (figura 19).

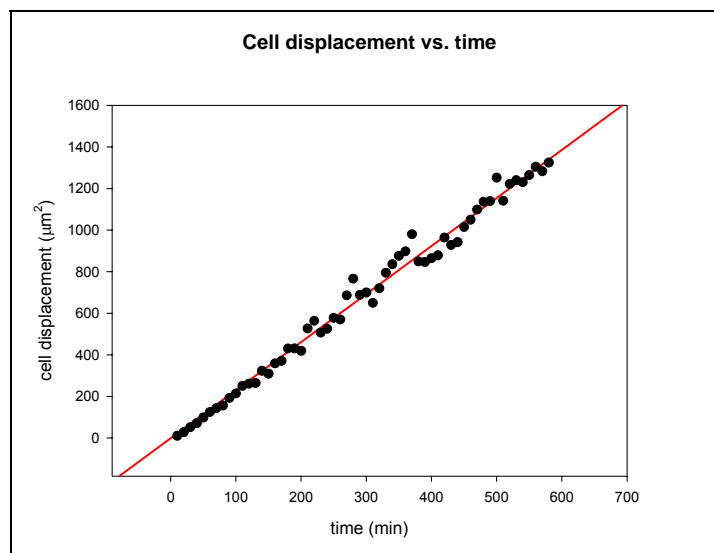


FIGURA 19. Andamento di $\langle D^2 \rangle$ vs. time

10.2 Tecnica e apparato sperimentale

Per poter determinare sperimentalmente la velocità e la direzionalità della migrazione, è stato messo a punto un sistema in grado di seguire e registrare il movimento delle cellule su di un substrato in un prefissato intervallo di tempo. I campioni vengono tenuti per un certo periodo sotto osservazione, usando un sistema sperimentale di cinematografia che permette di acquisire immagini, ossia di “fotografare” il campione a vari istanti scelti dall’utente. Se T è il tempo totale di durata dell’esperimento e Δt è il tempo che trascorre tra una acquisizione e l’altra, $N = T/\Delta t$ è il numero di immagini totali che il computer acquisisce nel corso dell’esperimento. Tale sistema è detto *time lapse*.

Poiché gli esperimenti necessari per studiare la migrazione richiedono tempi più o meno lunghi, è stato necessario mettere a punto un’apparecchiatura, in cui introdurre i campioni, che ricreasse le condizioni fisiologiche adatte a mantenere in vita le cellule.

A tal scopo si è realizzato un mini-incubatore, in cui le cellule trovano un ambiente a temperatura e anidride carbonica controllata. Il mini-incubatore è una camera in plexiglass in cui viene fatta circolare aria, resa umida a monte mediante gorgogliamento in acqua sterile. Il flusso d’aria si miscela a quello di CO_2 prima di entrare in camera. Le portate di aria e CO_2 devono essere tali da realizzare una miscela al 5% di anidride carbonica e al 95% di aria con una umidità relativa del 95%, perché tali sono le condizioni fisiologiche in cui si trovano le cellule *in vivo*. Le portate volumetriche di aria e CO_2 , tali da garantire nell’incubatore le condizioni “fisiologiche” di cui sopra, sono rispettivamente di 0,76 l/min e 0,04 l/min. A monte del sistema vi sono due flussimetri, che consentono di regolare la portata entrante in

camera, sia di anidride carbonica che di aria. L'ambiente all'interno del mini-incubatore è tenuto a temperatura di 37°C mediante un piano di alluminio riscaldato in cui sono inserite termoresistenze. Il tutto è collegato ad un controllore di temperatura PID, che consente un'accuratezza di mezzo grado centigrado.

L'incubatore è progettato in modo da permettere all'utente di osservare contemporaneamente sei campioni (non necessariamente uguali) preparati in piastrine da 35 mm di diametro (figura 20).

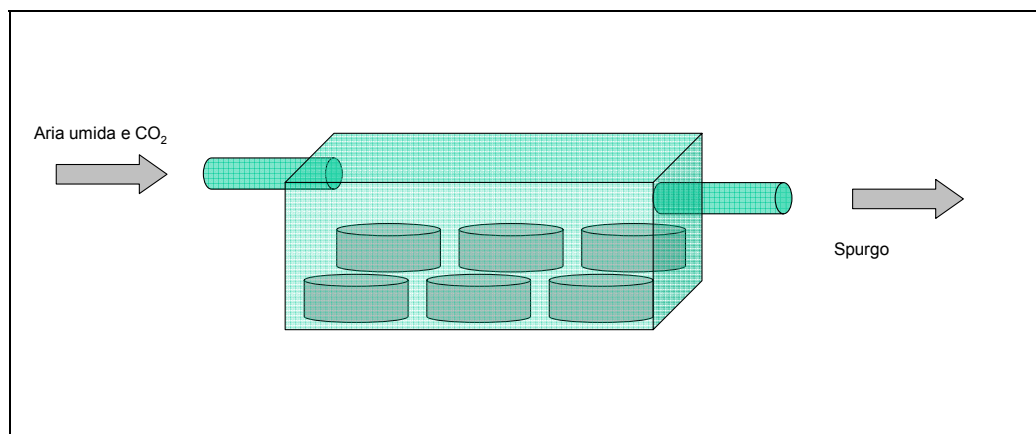


FIGURA 20. Schema del mini-incubatore.

Tale strumento si trova su di un piano motorizzato o *stage*. Lo stage, spostandosi lungo x e y, permette di controllare le posizioni del centro della cellula. Tutto il sistema è posto su di un microscopio rovesciato, modello IX 50 della Olympus. Tale microscopio, oltre a permettere osservazioni in campo chiaro e in contrasto di fase, è equipaggiato con il corredo necessario per osservazioni in fluorescenza. E' dotato, inoltre, di un'uscita per una videocamera e di una telecamera Coolsnap della Crisel Instruments (figura 21).

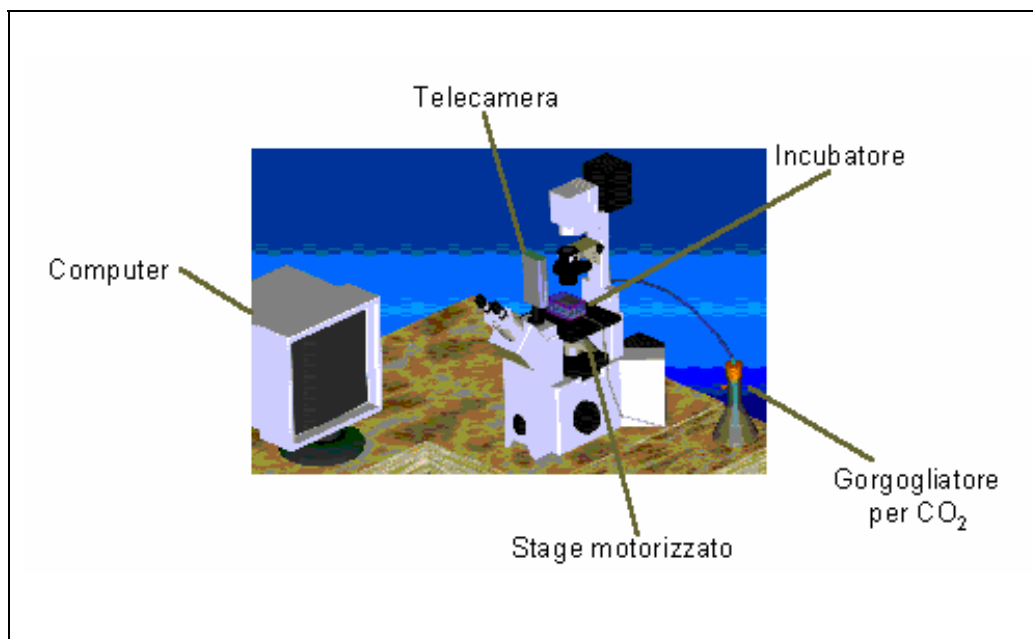


FIGURA 21. Schema dell'apparato sperimentale per la migrazione cellulare.

Per poter “filmare” il movimento cellulare è stato utilizzato un software, Meta Imaging System, che permette di acquisire immagini, controllare automaticamente lo stage motorizzato, realizzare e successivamente analizzare filmati. Tale software è in grado di acquisire immagini per intervalli di tempo brevi o lunghi a seconda delle esigenze sperimentali. Per poter “fotografare” diversi campi contemporaneamente, si è fatto in modo che lo stage si spostasse automaticamente in ogni punto, precedentemente scelto, del campione. A tal scopo sono stati scritti vari “codici” o *journals*, che permettono di scegliere i campi desiderati come posizioni nello spazio e memorizzarli in una lista. Quando si fa “correre” il journal, lo stage si riporta nelle n posizioni scelte dall'utente in modo che la telecamera acquisisca contemporaneamente dai vari campi scelti. Alla fine dell'esperimento si hanno N immagini per n punti. Dopo l'acquisizione delle immagini, si procede alla creazione del filmato, lo *stack*, utilizzando un codice scritto in Matlab, e successivamente si passa all'analisi dello stesso. Lo scopo è ricostruire il percorso di ogni cellula per poter determinare la velocità e la persistenza. Tale analisi viene effettuata mediante Discovery One di Meta Imaging, usando la tecnica del *cell tracking*, che permette di seguire ogni singola cellula e ricostruire il percorso che la stessa ha compiuto durante l'esperimento. La tecnica del cell tracking esamina lo stack in ordine cronologico ricercando l'esatta sequenza delle posizioni associate al percorso della cellula, quindi genera 2 vettori contenenti rispettivamente le coordinate x e y delle posizioni da essa assunte. Riportando in un diagramma le coordinate (x , y) di una singola cellula, si ottiene la traiettoria sperimentale percorsa (figura 22).

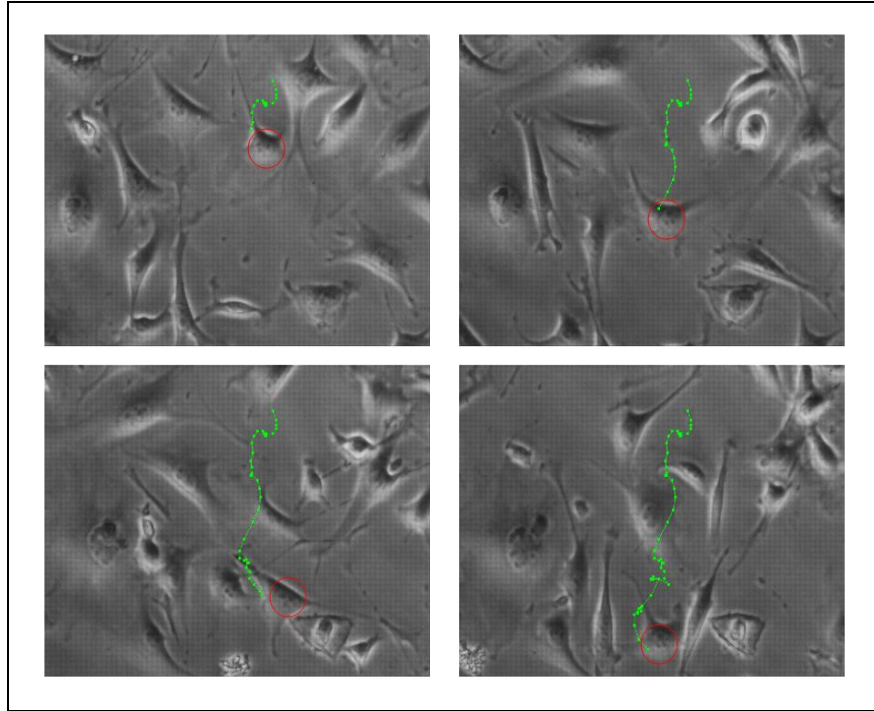


FIGURA 22. Traiettoria sperimentale percorsa da una cellula.

I dati sono analizzati e “fittati” mediante il modello persistent random walk, ossia il modello teorico di Stokes-Lauffenburger, usando un codice scritto in Matlab. L’algoritmo consente di calcolare le distanze di un’immagine dall’altra discretizzando il percorso compiuto dalla cellula.

Le equazioni usate sono le seguenti:

$$d_{ij} = \left[(x_i - x_{i-1})^2 + (y_i - y_{i-1})^2 + (z_i - z_{i-1})^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (3)$$

$$D_j^2 = \frac{1}{N} \cdot \sum_{i=1}^N (d_{ij})^2 \quad (4)$$

$$\langle D^2 \rangle = \frac{1}{M} \cdot \sum_{j=1}^M D_j^2 \quad (5)$$

La distanza d_{ij} è calcolata per differenti intervalli di tempo e per ogni singola cellula (nell’equazione (3), la z viene considerata solo nel caso di campioni in 3D). Dopo aver calcolato la distanza geometrica tra un’immagine e l’altra, si calcola, grazie all’equazione (4), la distanza media della cellula j , D_j , lungo tutto l’intervallo di tempo, dove N rappresenta il

numero di immagini acquisite per la cellula. Questa procedura si ripete per un certo numero di cellule M , che scegliamo nel filmato. Possiamo così calcolare la D da una media delle distanze D_j (dove i varia tra il tempo t_0 e t_n , mentre j tra 1 e M cellule) relative alle cellule scelte per l'esperimento. A questo punto, partendo dal coefficiente di diffusione μ e dal valore di $\langle D^2 \rangle$, si determinano, tramite l'equazione (1), la velocità (coefficiente di pseudo-diffusione) e la direzionalità della migrazione (persistence length).

10.3 Preparazione dei campioni per gli esperimenti di migrazione sugli idrogeli e i monostrati di PEG

La linea cellulare utilizzata per la preparazione di tutti i campioni è rappresentata da fibroblasti embrionali di topo, NIH 3T3.

La procedura utilizzata è la seguente:

- Si procede alla conta del numero di cellule mediante l'utilizzo della *camera di Neubauer*.
- Si sospendono le cellule NIH3T3 in DMEM + siero (1%) (circa 10^5 cellule/ml).

La scelta di tale numero di cellule deriva da un compromesso ottimale tra il fatto che le cellule devono avere sufficiente spazio per migrare, ma è anche necessario che in ogni campo scelto ve ne sia un numero sufficiente (minimo dieci) per poter valutare una velocità media della popolazione cellulare.

- Si piastrano le cellule (circa 1 ml di soluzione in ogni piastrina) e si lasciano in incubazione a 37°C per 3h.
- Le cellule non adese vanno eliminate mediante lavaggi con PBS, prima di reintrodurre il terreno fresco (DMEM + siero).

I campioni così ottenuti vengono incubati per 24h, al fine di permettere alle cellule adese di assumere la corretta morfologia e "prepararsi" alla fase di migrazione, e posti, poi, nel mini-incubatore per potere essere ripresi.

10.4 Fase sperimentale

I campioni vengono introdotti nel mini-incubatore, situato sul piano motorizzato. Tale piano permetterà alla telecamera di acquisire le immagini delle diverse zone (prescelte nelle piastre) in corrispondenza dei tempi fissati dall'utente, spostandosi da un campione all'altro. Per seguire la migrazione cellulare è stato utilizzato il software Meta Imaging System che permette di memorizzare:

- la durata totale dell'esperimento, T ;
- il tempo che trascorre tra un'acquisizione e l'altra di ogni zona, Δt ;
- l'intervallo in cui lo stage resta immobile su ogni zona ("punto") e consente la ripresa della telecamera, Δt_{punto} ;
- il tempo morto che impiega lo stage per passare da una zona all'altra, *delaytime*, mentre la telecamera si disattiva momentaneamente.

Negli esperimenti realizzati si sono fatte le seguenti scelte:

- $T = 18h$
- $\Delta t = 10 \text{ min}$
- $\Delta t_{punto} = 5 \text{ sec}$
- $delaytime = \Delta t - [2 \cdot n \cdot \Delta t_{punto}]$

dove n il è il numero di campi scelti.

La prima operazione condotta in questa fase sperimentale è stata quella di individuare nei campioni, grazie all'uso del microscopio, le zone con maggiore concentrazione di cellule, in modo da poter riprenderne il più possibile. Tali scelte sono memorizzate dal computer grazie all'utilizzo di un codice, detto *journal*, che li registra in una lista come posizione nello spazio x, y, z (ricordiamo che oltre a fissare posizione lungo x e y , si fissa anche la posizione z del piano focale rispetto al quale le cellule sono a fuoco). Avviato il sistema, il computer darà il comando sia allo stage che alla telecamera di svolgere le proprie funzioni nelle condizioni prestabilite. Terminato il tempo di ripresa, si ritrovano memorizzate sul computer, per ogni punto selezionato, un numero di immagini N (con $N=T/\Delta t$), corrispondenti a differenti istanti, partendo dal tempo iniziale t_0 . Si avrà così al tempo:

- $t_0 \rightarrow$ prima immagine del punto P_1
- $t_1 \rightarrow$ prima immagine del punto P_2
- $t_2 \rightarrow$ prima immagine del punto P_3
-
- $t_k \rightarrow$ prima immagine del punto P_n
- $t_{k+1} \rightarrow$ seconda immagine del punto P_1
-
-
- $t_f \rightarrow$ ultima immagine del punto P_n

Dopo l'acquisizione delle immagini (*frames*) corrispondenti agli n punti fissati, si procede alla creazione degli n filmati (*stacks*) utilizzando un codice scritto in matlab, *BUILDSTACK*, che permette di sovrapporre i frames relativi ad ogni punto. In tal modo si potrà avere la

possibilità di analizzare, da un unico esperimento, ben n filmati.

10.5 Analisi dei dati

L'analisi sperimentale, adottata per l'individuazione dei parametri caratteristici della migrazione cellulare, si basa sulla tecnica del *Cell tracking*. Dopo aver creato i filmati, che mostrano l'evoluzione delle cellule in un intervallo di tempo e nella zona prescelta del campione, tale tecnica permette di ricostruire il percorso seguito dalla singola cellula durante l'esperimento. Scelta la cellula da seguire, si utilizza un comando in Discovery one, *Track object*, capace non solo di visualizzare sullo schermo del computer, durante l'esecuzione del filmato, la traiettoria cellulare, ma anche di memorizzare in un file le posizioni (x, y) assunte dalla cellula nell'intervallo *T* di durata dell'esperimento. Questa operazione si effettua per un certo numero di cellule (in genere, da 10 a 15), presenti nel medesimo filmato o in filmati relativi allo stesso campione, al fine di valutare le rispettive traiettorie ed ottenere le relative posizioni (x, y) sottoforma di file. Successivamente, i file vengono elaborati da un codice in matlab, **prw3** (*persistent random walk*), il quale consente di calcolare, secondo il modello di Stokes-Lauffenburger [Lauffenburger, 1991], i parametri caratterizzanti la migrazione: la velocità *S* (che è una media delle velocità di tutte le cellule seguite), e il tempo di persistenza *P* (che indica, invece, il tempo medio trascorso dalle cellule senza andare incontro a significativi cambiamenti direzionali); si ottiene anche un diagramma (*fit*), previsto da tale modello, in cui è visualizzata la media del quadrato del cell displacement, $\langle D^2 \rangle$, in funzione del tempo.

RISULTATI

1 PEG-SAMs

1.1 Caratterizzazione delle superfici

Al fine di avere conferma dell'efficacia del protocollo utilizzato per la realizzazione dei substrati di PEG, si è effettuata un'analisi ATR [Zhu et al., 2001] di uno dei campioni prodotti, ottenuto utilizzando una soluzione di PEG-SH (figura 23). Lo spettro ha confermato la presenza del polimero sulla superficie del vetrino. Sono stati evidenziati, in particolare, i seguenti picchi, relativi a legami fra atomi della catena di PEG: a $1092,91 \text{ cm}^{-1}$ è stata rilevata la presenza del picco caratteristico della vibrazione di *stretching* dei legami C-C e C-O; a 1246.87 cm^{-1} , 1341.78 cm^{-1} e 1411.80 cm^{-1} lo spettro ha mostrato, invece, i picchi relativi alle

vibrazioni, rispettivamente, di *twisting*, *wagging* e *scissoring* del legame EG(etilen-glicole)-CH₂.

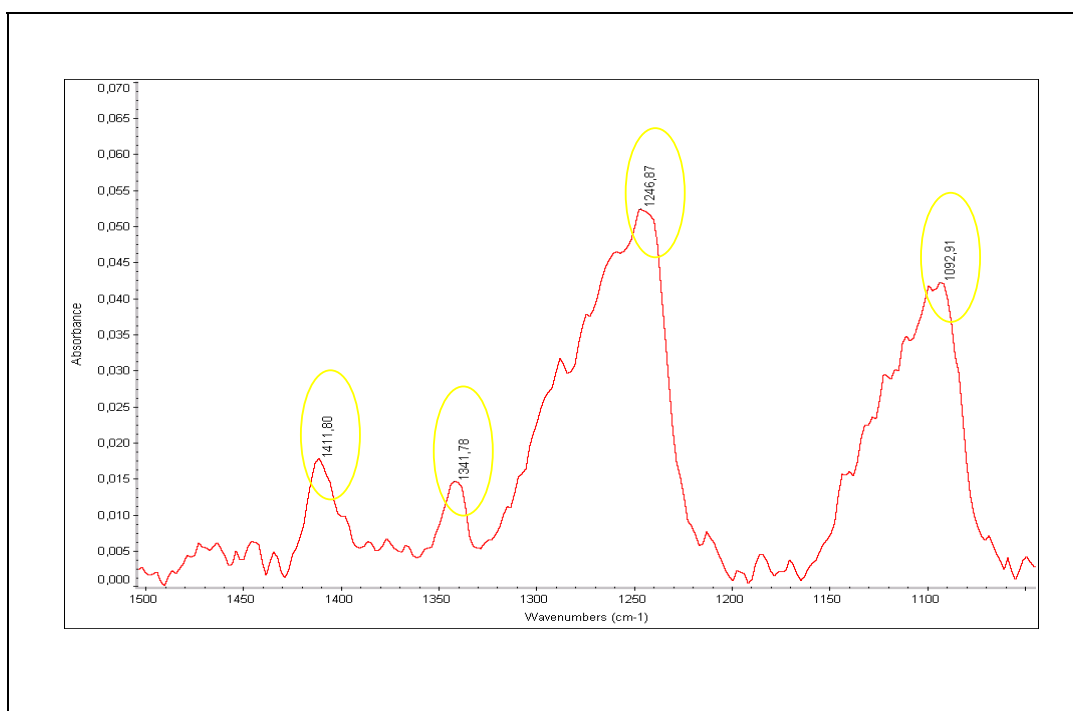


FIGURA 23. Spettro ATR di PEG-SAMs.

1.2 Osservazioni al microscopio ottico della morfologia cellulare

Una volta ottenute le superfici volute, si è passati a valutare la risposta cellulare e, quindi, la biocompatibilità delle stesse. Per le prove biologiche, sono stati scelti fibroblasti murini NIH3T3 noti per crescere adesi al substrato e, perciò, ottimali per i nostri studi. Le suddette cellule sono state seminate su substrati di vetro, oro, PEG-SAMs, RGD-PEG-SAMs e RGD-(PEG)2-SAMs. Dopo 5h di incubazione a 37°C, le osservazioni al microscopio mostrano cellule perfettamente adese e distese sul vetro (controllo positivo, figura 18 A) e cellule tondeggianti sull'oro (figura 24 B). La morfologia cellulare appare simile al controllo negativo su oro, anche per le cellule seminate su PEG-SAM e RGD-PEG-SAM (figura 24 C e D). Sull'RGD-(PEG)2-SAM, invece, il numero di cellule rimaste attaccate è molto esiguo e queste poche sono aggregate in piccoli clonetti (figura 18 E).

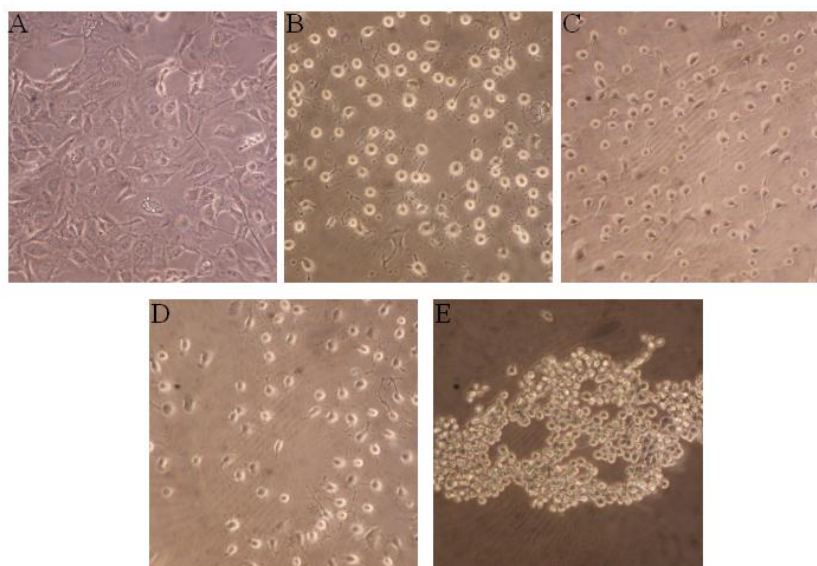


FIGURA 24. Adesione di NIH 3T3 dopo 5h dalla semina. A:vetro; B: oro; C: PEG-SAM; D: RGD-PEG-SAM; E: RGD-(PEG)2-SAM.

A 24h dalla semina, le cellule su vetro hanno formato un monostrato uniforme e sono perfettamente appiattite sulla superficie (figura 25 A). Le cellule sull'oro sono rimaste tonde, a prova del fatto che il riconoscimento di tale materiale non è specifico. Sull'RGD-PEG-SAM le cellule hanno assunto la corretta morfologia simile a quella del controllo positivo, anche se il numero di cellule adese è inferiore al controllo (figura 25 D). Sul PEG-SAM, invece, alcune cellule sono rimaste tondeggianti ed altre sono non completamente distese, come mostrato dalla figura 25 C. Infine la figura 25 E mostra le cellule sull'RGD-(PEG)2-SAM che hanno formato una massa cellulare amorfa.

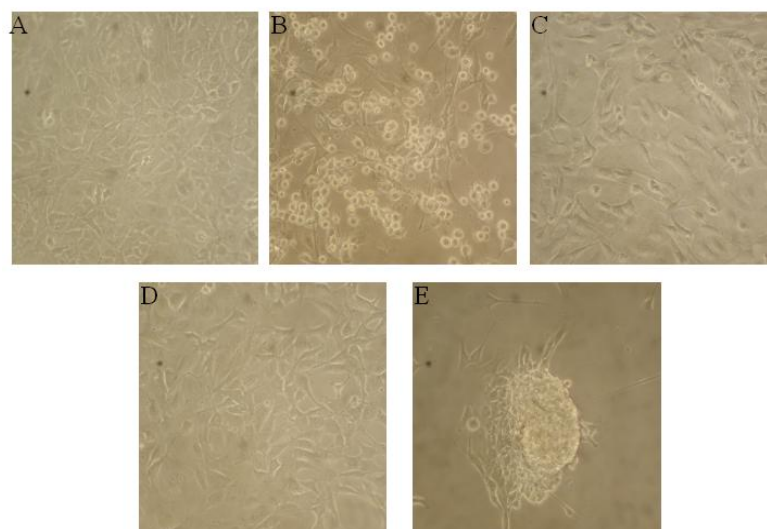


FIGURA 25. Adesione di NIH 3T3 dopo 24h dalla semina. A:vetro; B: oro; C: PEG-SAM; D: RGD-PEG-SAM; E: RGD-(PEG)2-SAM.

1.3 Localizzazione dei contatti focali e degli elementi del citoscheletro

L'adesione cellulare avviene in maniera corretta solo se tra le cellule ed il substrato si instaura una relazione specifica, dettata da un riconoscimento biologico del materiale. Tale interazione specifica determina la formazione di strutture cellulari complesse chiamate "focal contacts" e "stress fibres". Per verificare che l'adesione alle nostre superfici fosse specifica, abbiamo condotto un'esperimento di immunofluorescenza indiretta al fine di localizzare la vinculina, proteina componente dei focal contacts, e l'actina, proteina dei microfilamenti citoscheletrici, deputata alla formazione di "stress fibres". La figura 26 mostra le immagini al microscopio confocale di NIH3T3 piastrate su substrati diversi e marcate con anticorpo anti-vinculina (verde) e falloidina (rosso). Come si osserva in figura 26 A, oltre ad essere diffusa nel citoplasma, la vinculina è solitamente organizzata in strutture discrete situate ai margini cellulari in prossimità dei punti di contatto della cellula al substrato ("focal contacts"). In cellule seminate sull'oro tali strutture non sono evidenti e la vinculina, diffusa nel citoplasma, ha un segnale fluorescente molto basso (figura 26 B). Nelle cellule su RGD-PEG-SAMs, la vinculina si organizza in focal contacts con una distribuzione simile al controllo positivo (figura 26 D). Lo stesso si osserva per le poche cellule che aderiscono su RGD-(PEG)2-SAMs, anche se il segnale appare più debole (figura 26 E). Nel caso del PEG-SAMs, le cellule assumono una morfologia diversa, con il corpo cellulare grande e tondeggiante ed i prolungamenti sottili e ramificati, molto simili a cellule nervose. In queste cellule la vinculina non si organizza in focal contacts (figura 26 C). L'actina, invece, si assembla a formare microfilamenti che costituiscono il citoscheletro cellulare. In cellule di controllo, i microfilamenti di actina sono disposti parallelamente all'asse maggiore della cellula ed, ai bordi cellulari, proprio al di sotto della membrana plasmatica, questi microfilamenti si uniscono a formare fasci più spessi, chiamati "stress fibres" (figura 26 F). Le "stress fibres" conferiscono alla cellula la sua particolare forma allungata e appiattita. Infatti, sull'oro, dove le cellule sono tonde, l'actina è rimasta sotto forma di monomero, senza formare alcun filamento (figura 26 G). Sull'RGD-PEG-SAMs, l'organizzazione del citoscheletro di actina è paragonabile al controllo positivo, con "stress fibres" perfettamente assemblate (figura 26 I). Sui monolayers di RGD-(PEG)2, i microfilamenti di actina appaiono assemblati in maniera disorganizzata, con fibre non ben orientate e piccole fibrille (forse filopodi) in prossimità dei punti di contatto focale (figura 26 J). Infine, sulle superfici di PEG-SAMs, le cellule non mostrano alcuna formazione di microfilamenti di actina (figura 26 H).

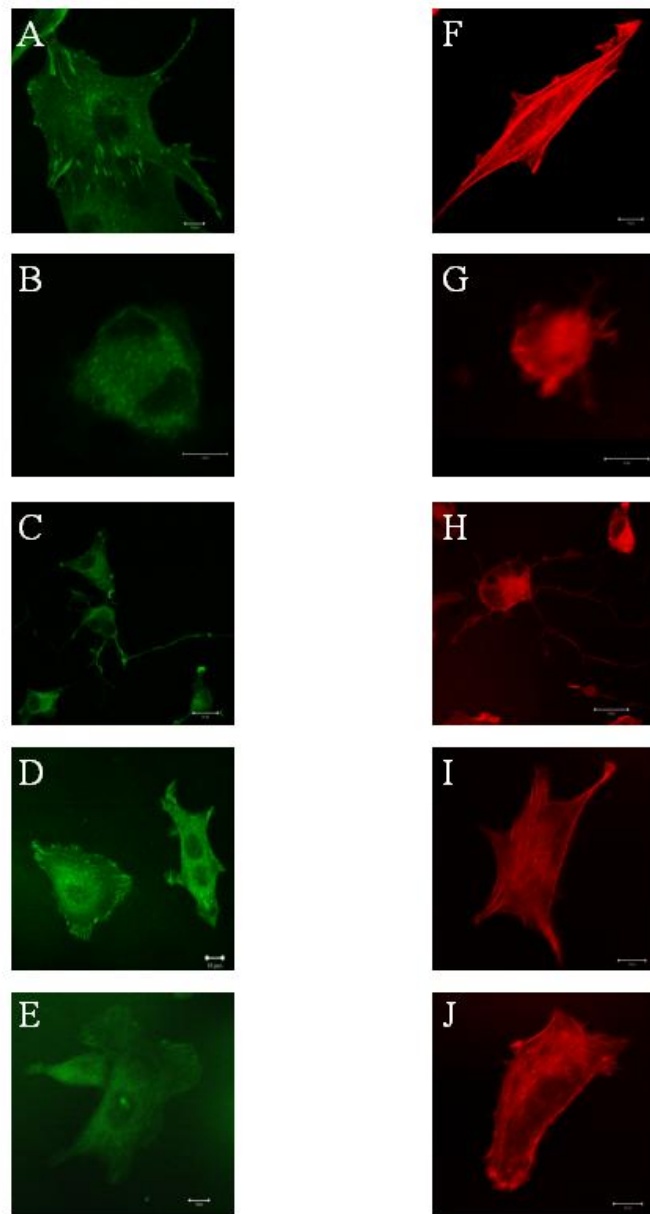


FIGURA 26. Immunofluorescenza per vinculina (verde) e actina (rosso).

1.4 Proliferazione cellulare

Per osservare la vitalità delle cellule nel tempo, è stato eseguito un saggio di proliferazione cellulare (Alamar Blue Assay). La figura 27 illustra i risultati del test.

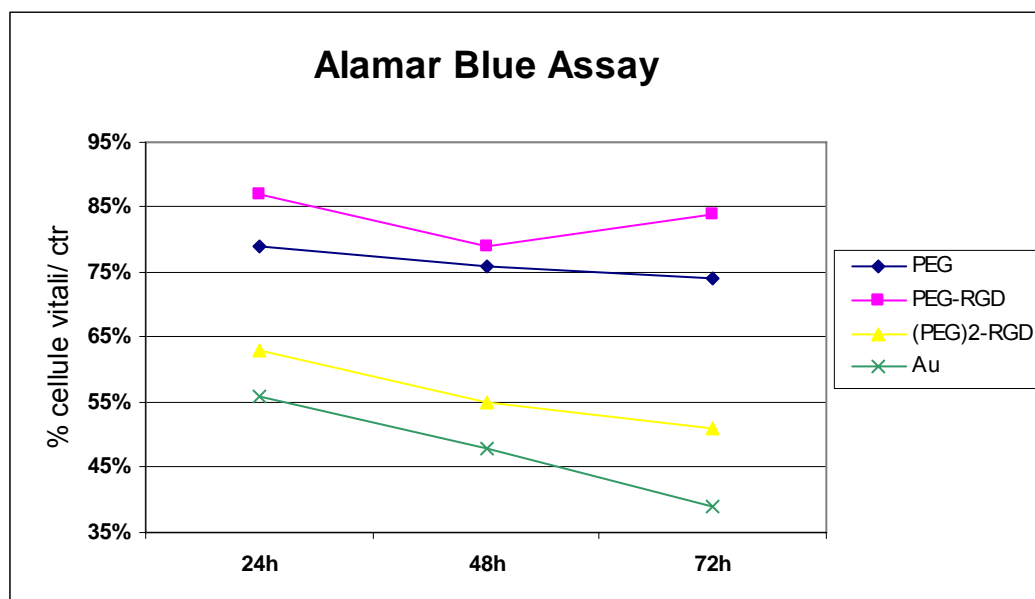


FIGURA 27. Risultati del saggio di proliferazione.

Come si può notare, la percentuale di cellule vitali dopo 24, 48 e 72h è maggiore sui SAMs realizzati con PEG-RGD rispetto a quelli ottenuti da soluzione di PEG: sembra, quindi, confermata la funzione adesiva svolta dal peptide.

Si può osservare, inoltre, come la maggiore lunghezza della catena ((PEG)₂-RGD rispetto a PEG-RGD) tenda a deprimere la proliferazione, a conferma del fatto che, probabilmente, l'aumento della flessibilità ostacola l'attività cellulare.

1.5 Risultati degli esperimenti di migrazione cellulare

Al fine di evidenziare l'influenza della flessibilità del substrato sull'attività migratoria delle cellule, sono stati condotti esperimenti di migrazione cellulare sui vari SAMs realizzati. La tabella 1 illustra i risultati ottenuti, mentre le figure successive riportano l'andamento del *cell displacement* $\langle D^2 \rangle$ in funzione del tempo per le cellule NIH 3T3 sui tre tipi di PEG-SAMs presi in considerazione.

Risultati esperimenti di migrazione			
	PEG-SAMs	RGD-PEG-SAMs	RGD-(PEG) ₂ -SAMs
Cell Speed S [μm/min]	1,1842	1,9090	1,2645
Persistence Length P [min]	10,4562	8,5452	15,3336

Tabella 1. Risultati degli esperimenti di migrazione di NIH3T3 su PEG-SAMs.

Le velocità di migrazione, registrate in corrispondenza dei SAMs terminati con l'RGD (RGD-PEG-SAMs e RGD-(PEG)₂-SAMs), risultano superiori rispetto a quelle ottenute per catene prive del peptide d'adesione (PEG-SAMs). Tali risultati confermano l'importanza dell'RGD non solo nella fase di adesione cellulare, ma anche nella successiva fase di migrazione.

Va rilevato, inoltre, come a parità di condizioni (es. presenza di RGD), la velocità sia superiore per i SAMs aventi lunghezza inferiore (RGD-PEG-SAMs rispetto a RGD-(PEG)₂-SAMs); se ne deduce che una maggiore flessibilità della catena non solo tende a limitare, come già dimostrato, l'adesione e la proliferazione cellulare, ma ne ostacola anche la capacità migratoria.

L'andamento pressoché lineare di $\langle D^2 \rangle$ vs. time in tutti gli esperimenti condotti (figure 28, 29 e 30), infine, conferma ancora una volta l'attendibilità del modello di Stokes-Lauffenburger.

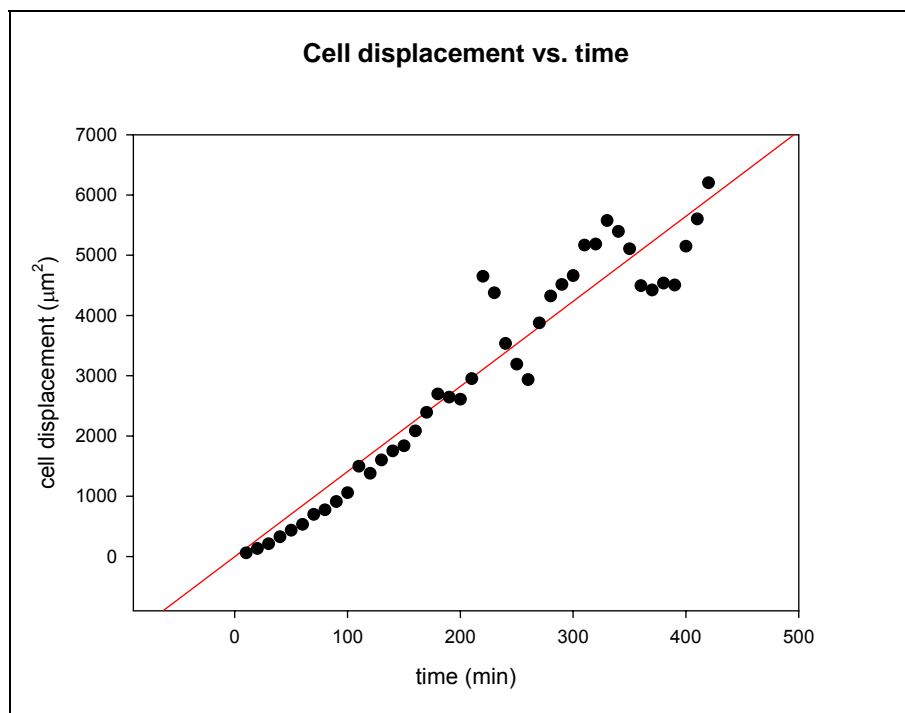


FIGURA 28. Andamento di $\langle D^2 \rangle$ vs. time per NIH 3T3 su PEG-SAMs.

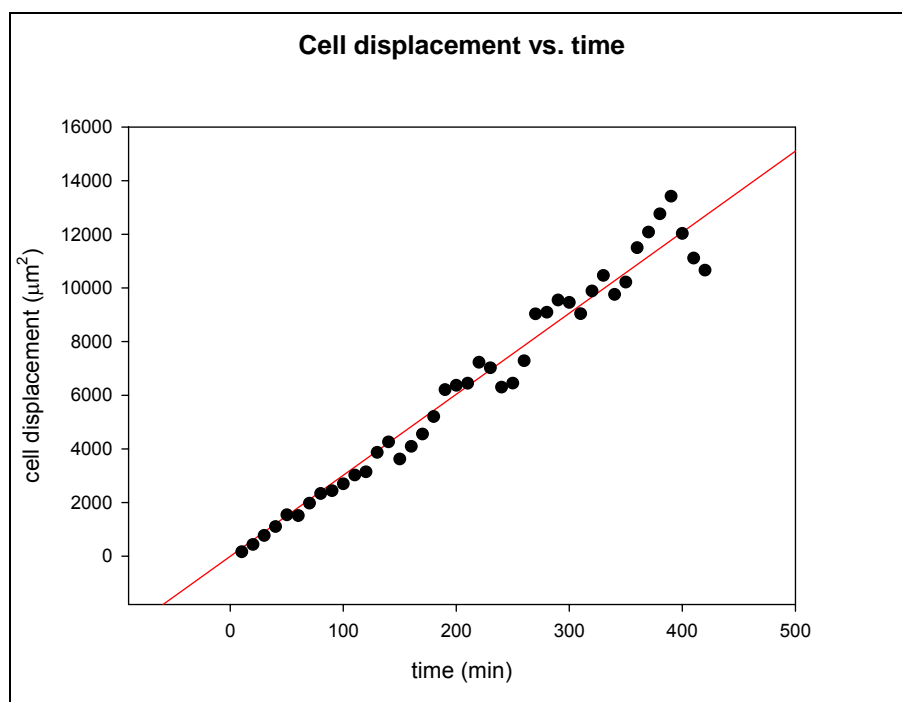


FIGURA 29. Andamento di $\langle D^2 \rangle$ vs. time per NIH 3T3 su RGD-PEG-SAMs.

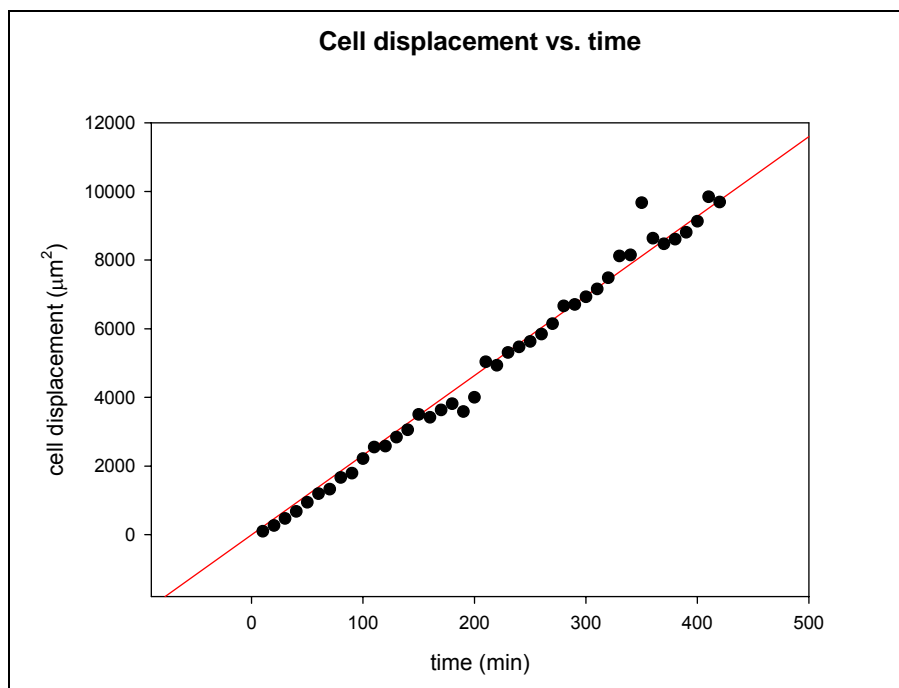


FIGURA 30. Andamento di $\langle D^2 \rangle$ vs. time per NIH 3T3 su RGD-(PEG)₂-SAMs.

2 IDROGELI DI PEG

2.1 Caratterizzazione delle superfici

Al fine di verificare l'effettiva esposizione dei peptidi RGD sulla superficie degli idrogeli di PEG, è stata condotta l'analisi ATR-FTIR su campioni costituiti da idrogeli di PEG3400 (10%) e idrogeli di PEG3400 (10%) – RGD 5 mM.

Dal confronto dei rispettivi spettri è risultato che, per gli idrogeli di PEG3400 – RGD 5 mM, diversamente che per gli idrogeli di PEG3400, l'analisi dello spettro IR ha mostrato un picco a 1548 cm^{-1} , caratteristico della vibrazione di *bending* (piegamento) dei legami N–H e C–N presenti nel peptide RGD, ed un altro picco a $\sim 1650\text{ cm}^{-1}$ (parzialmente coperto dal “rumore di fondo” dell'acqua, non completamente eliminabile con la procedura di essiccazione utilizzata), caratteristico dello *stretching* (stiramento) del legame C=O.

La figura 31 riporta, sovrapposte nella stessa immagine, le porzioni degli spettri relativi ai due idrogeli. I due picchi citati, evidenti nello spettro inferiore, non solo confermano la presenza nel campione dell'RGD, ma danno anche, essendo l'ATR un'analisi superficiale, la certezza della sua “espressione” verso l'esterno dell'idrogelo (zona in cui le cellule saranno seminate).

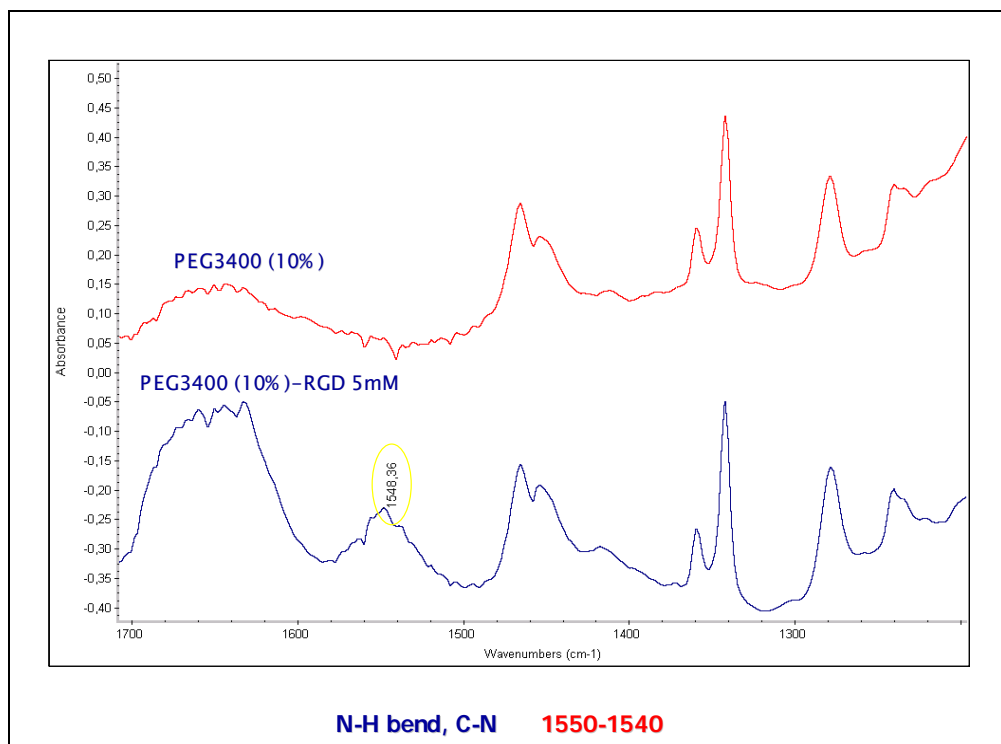


FIGURA 31. Spettro ATR di idrogeli di PEG3400 (10%) e PEG3400 (10%)-RGD 5mM.

2.2 Adesione cellulare

Per verificare il riconoscimento biologico degli idrogeli funzionalizzati con RGD, è stato condotto un saggio di adesione di cellule NIH3T3. I risultati delle prove sono mostrati nel grafico di figura 32.

Risulta evidente come l'aggiunta di RGD all'idrogelo fornisca una notevole capacità di adesione cellulare. Se nei campioni senza RGD la percentuale di cellule aderite non supera mai il 10%, già la concentrazione di RGD più bassa presa in considerazione (0.5 mM) garantisce una adesione non inferiore a circa il 60% delle cellule piastrate.

Tuttavia non c'è un chiaro trend di risultati all'aumentare della concentrazione di RGD. Per i campioni al 10 e al 20% di PEG si registra un massimo dell'adesione per la concentrazione intermedia di PEG-RGD (1mM), mentre per i campioni al 5% di PEG l'adesione evidenzia un picco in corrispondenza del valore 0.5 mM, per poi decrescere. E' possibile, comunque, individuare un dominio, in corrispondenza delle concentrazioni 1 mM di PEG-RGD e 10 e 20% wt di PEG, in cui si registrano percentuali di adesione molto elevate, superiori all'80%.

Anche la concentrazione di polimero e, quindi, la rigidità del substrato, influenzano la capacità delle cellule di aderire alla superficie. Si può notare, infatti, come una matrice eccessivamente "soffice" tenda a limitare l'adesione: l'idrogelo al 5% di PEG mostra, a parità di RGD presente, percentuali di adesione sempre inferiori rispetto agli idrogeli più rigidi.

Inoltre, all'aumentare della percentuale di PEG, aumenta il numero di cellule adese. Tale valore raggiunge il massimo per gli idrogeli al 20% di PEG, per poi decrescere bruscamente per il PEG al 40%, dove le cellule non riescono ad aderire (dati non mostrati).

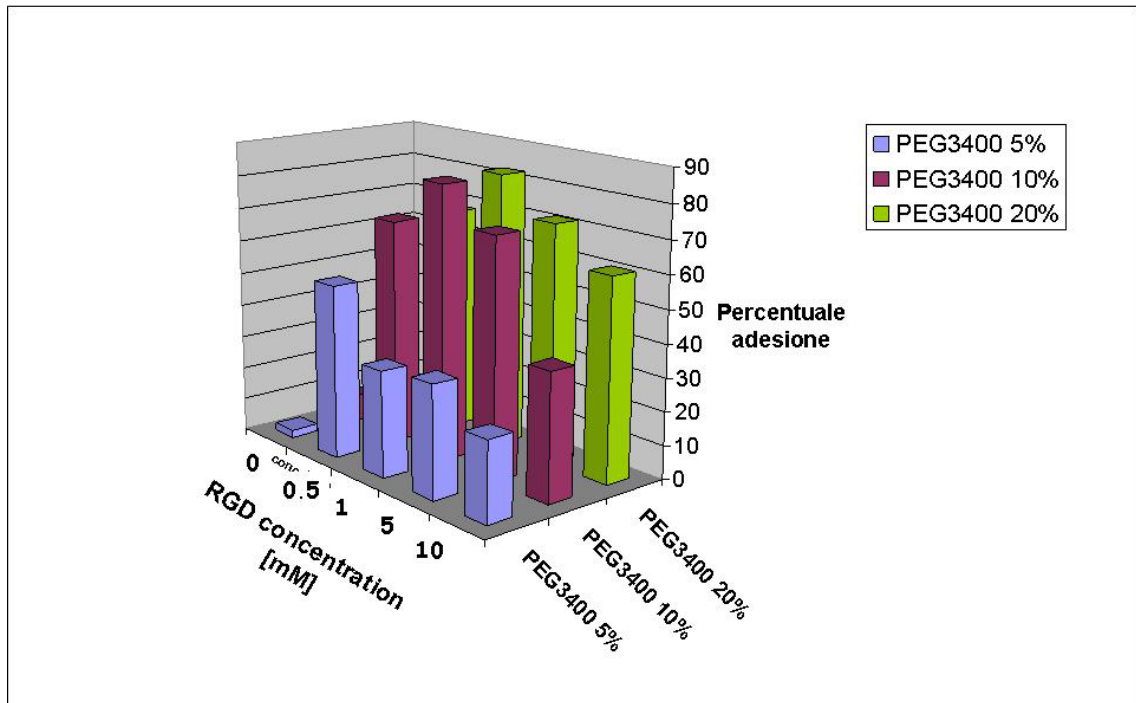


FIGURA 32. Risultati prove di adesione.

Le osservazioni al microscopio confocale delle immunofluorescenze per vinculina e actina confermano questi risultati. Su idrogeli meno rigidi (PEG3400 10%) l'organizzazione dei contatti focali e del citoscheletro di actina risulta essere meno definita rispetto a quella riscontrata sugli idrogeli di PEG3400 al 20% a parità di concentrazione di RGD 1 mM (figure 33 e 34).

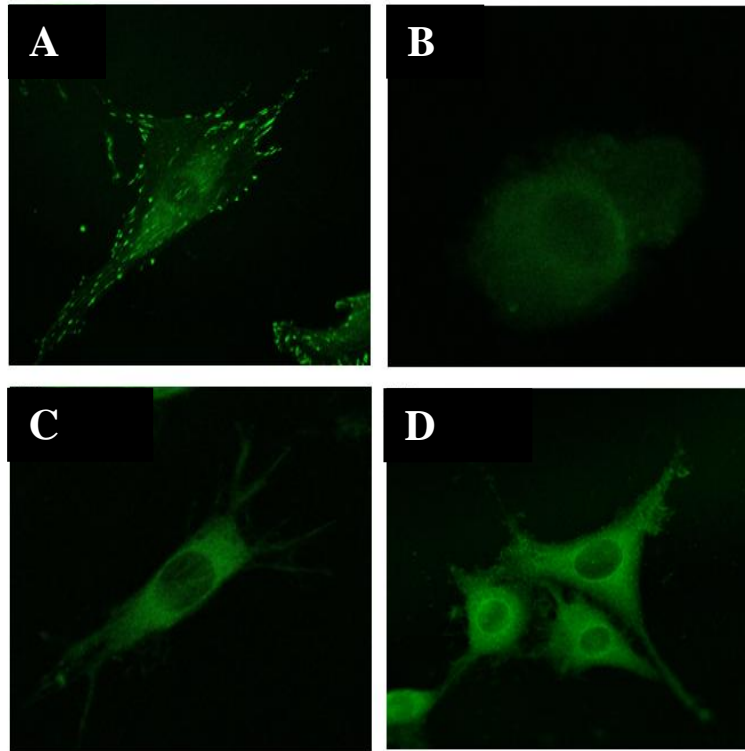


FIGURA 33. Immunolocalizzazione della vinculina su cellule NIH3T3 seminate su vetro (A), PEG 20% (B), PEG10% RGD 1 mM (C), PEG20% RGD 1 mM (D). Obiettivo 20x

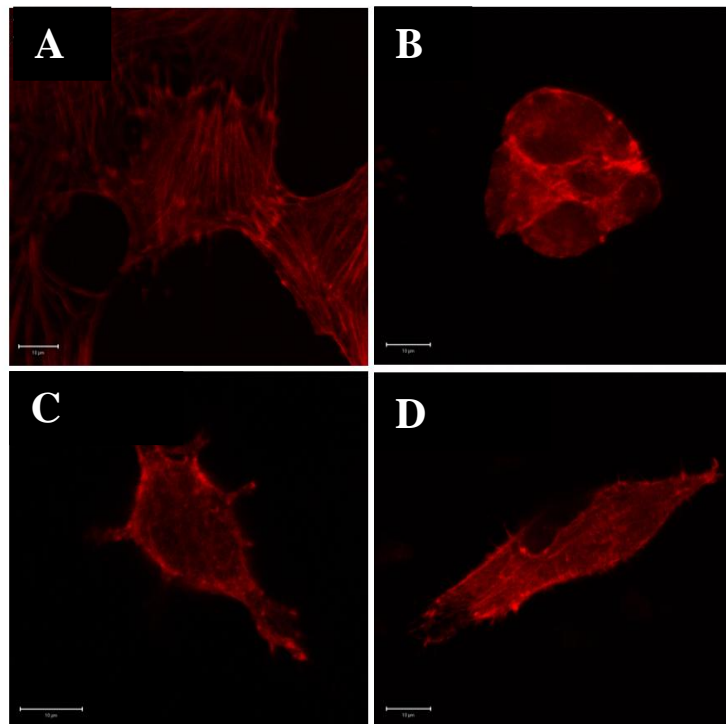


FIGURA 34. Colorazione dei microfilamenti di actina di cellule NIH3T3 seminate su vetro (A), PEG 20% (B), PEG10% RGD 1 mM (C), PEG20% RGD 1 mM (D). Obiettivo 20x

2.3 Risultati degli esperimenti di migrazione cellulare

In tabella 2 si riassumono schematicamente i risultati ottenuti dagli esperimenti di migrazione condotti sugli idrogeli di PEG.

MIGRAZIONE su IDROGELI di PEG3400		
	RGD 1 mM	RGD 5 mM
PEG 5%	Le cellule aderiscono ma non si registra migrazione	Le cellule aderiscono ma non si registra migrazione
PEG 10%	Le cellule aderiscono ma non si registra migrazione	Le cellule aderiscono e migrano $S = 0.7322 \mu\text{m}/\text{min}$ $P = 4.3563 \text{ min}$
PEG 20%	Le cellule aderiscono ma non si registra migrazione	Le cellule aderiscono ma non si registra migrazione
PEG 40%	Le cellule non aderiscono	Le cellule non aderiscono

Tabella 2. Risultati degli esperimenti di migrazione di NIH3T3 su idrogeli di PEG.

Notiamo, in primo luogo, come sugli idrogeli al 5% wt di PEG non si registri, indipendentemente dalla concentrazione di RGD, alcuna migrazione cellulare. Una situazione analoga si ripresenta anche per gli idrogeli al 20% di PEG, mentre su quelli al 40% le cellule non mostrano nemmeno alcuna capacità adesiva.

Sugli idrogeli realizzati con PEG al 10% wt si ha, invece, migrazione cellulare, anche se solo in corrispondenza della concentrazione 5 mM di RGD (figura 36). In figura 35 si riportano i valori di S e P e l'andamento di $\langle D^2 \rangle$ vs. time.

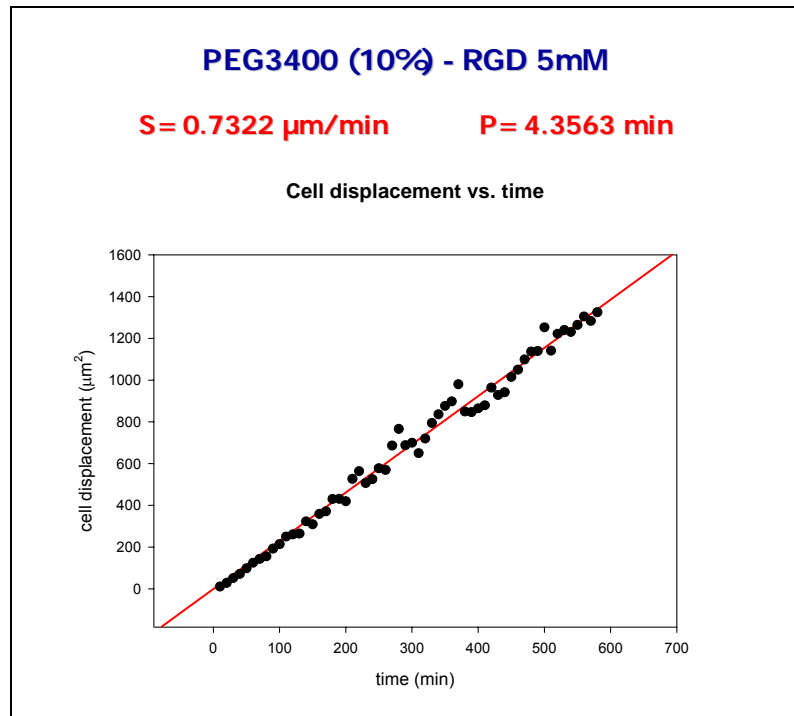


FIGURA 35. Dati di migrazione relativi all'idrogelo di PEG - RGD 5 mM.

L'andamento lineare di $\langle D^2 \rangle$ vs. time, infine, conferma la validità del modello di Stokes-Lauffenburger che, per lunghi intervalli temporali ($t \gg P$), prevede per le cellule un moto di carattere "diffusivo puro" (vedi MATERIALI E METODI).

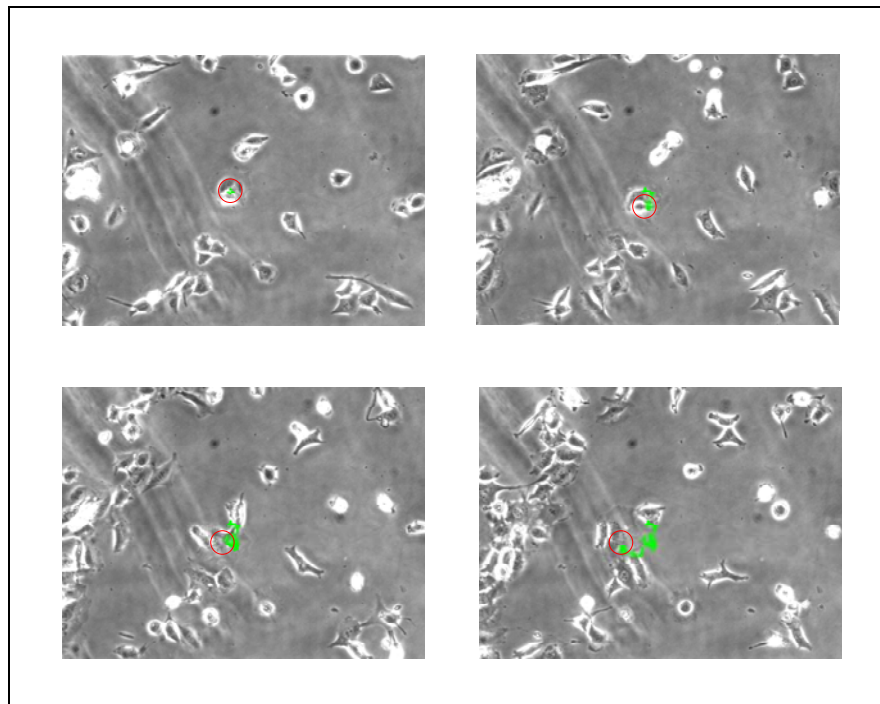


FIGURA 36. Cell tracking di una cellula NIH 3T3 su idrogelo di PEG3400 10% - RGD 5 mM.

3 GRADIENTI DI PEG-RGD

3.1 Adesione cellulare

Al fine di determinare se l'adesione cellulare dipendesse anche dalla orientazione dei segnali di adesione, sono stati preparati degli idrogeli di PEG con gradiente di RGD. Mantenedo fissa la lunghezza del campione (35 mm) è stato possibile far variare la ripidità del gradiente. Le cellule NIH3T3 sono state seminate su gradienti diversi con un range di concentrazione di RGD che variava da 0 a 5 mM, da 0 a 10 mM e da 0 a 20 mM. Dalle immagini al microscopio ottico si evidenzia come le cellule siano in grado di aderire a tutti e tre i gradienti (figura 37). Solo sul gradiente 0÷5 mM RGD, però, appaiono fusiformi e allineate lungo la direzione del gradiente. All'aumentare della ripidità del gradiente (0÷10 mM RGD e 0÷20 mM RGD), le cellule tendono a perdere la forma allungata e la loro orientazione secondo il gradiente, preferendo una forma tondeggiante e l'associazione in aggregati (figura 37).



FIGURA 37. Adesione cellulare su gradienti di PEG-RGD.

DISCUSSIONE

La presenza di segnali di adesione su un materiale è un requisito fondamentale per la corretta interazione delle cellule con quel materiale. L'adesione cellulare, però, può essere più finemente regolata modulando anche l'esposizione, la quantità e la distribuzione spaziale di questi segnali [Maheshwari et al., 1999].

Un altro dei maggiori aspetti dell'adesione cellulare ad un substrato rigido, contrariamente ad un ligando solubile, è la capacità di sviluppare forze a livello del sito di contatto. Tali forze, generate dall'apparato contrattile delle cellule, sono strettamente correlate con la capacità di queste ultime di assemblare i contatti di adesione alla matrice [Burrige e Chrzanowska-Wodnika, 1996; Bershadsky e Geiger, 1999; Helfman et al., 1999; Ingber, 1991]. E' stato

recentemente dimostrato che la trazione “rinforza” i contatti focali, cioè questi crescono se stimolati da una forza esterna [Choquet et al., 1997]. La risposta meccanosensoriale dei contatti focali è coinvolta nella autoregolazione del loro sviluppo. Ovviamente, la forza generata dalla cellula deve essere costantemente equilibrata dal substrato in modo da favorire il processo di contrazione del citoscheletro e lo “spreading” cellulare. Studi in cui le proprietà meccaniche di substrati elastici venivano sistematicamente variate hanno rivelato che il comportamento cellulare è dipendente dalla “compliance” meccanica del substrato [Lo et al., 2000].

Dai risultati mostrati in questo capitolo, si evince che l’esposizione e la distribuzione spaziale dei segnali e la rigidità del substrato giocano, senza dubbio, un ruolo fondamentale nei processi di adesione, proliferazione e migrazione cellulari.

I risultati ottenuti con i PEG-SAMs ci hanno mostrato che la presenza di segnali di adesione è indispensabile per un corretto riconoscimento biologico del materiale. Infatti, solo in presenza di PEG bioattivato con RGD, si osserva la formazione di focal contact e stress fibres (figura 26). Inoltre, questo primo modello sperimentale ci ha fornito informazioni sul ruolo giocato dalla lunghezza del polimero nell’influencare l’attività cellulare. Le cellule aderiscono, proliferano e migrano meglio su PEG3400-SAMs, cioè sono favorite da uno spaziatore più corto, piuttosto che sui PEG6800-SAMs, dove la catena di polimero è più lunga. Tali risultati possono essere interpretati analizzando in dettaglio il processo di adesione, in particolare la formazione dei “focal contacts”. Il riconoscimento del ligando da parte dell’integrina, attiva l’integrina stessa e determina il processo di reclutamento nel sito di contatto di altre integrine attivate (*clustering*). Il fenomeno di “clusterizzazione” delle integrine e, conseguentemente, l’avvicinamento dei segnali di adesione, che si trovano all’esterno della cellula, è mediato dal riarrangiamento del citoscheletro di actina che, insieme alla miosina, determina la generazione di una forza di trazione, che provoca, infine, lo “spreading” cellulare. È stato dimostrato che una singola fibra di actina è in grado di esplicare una forza di trazione di 1 pN per singola molecola di integrina attivata [Balaban et al., 2001]. Tale forza di trazione deve essere costantemente equilibrata dal substrato, perché si abbia l’adesione delle cellule.

Nel nostro caso la forza applicata determina un allungamento della catena di polimero. La risposta meccanica di una singola catena di polimero può essere facilmente descritta da un modello del tipo “freely jointed chain” (FJC) [Oosterhelt et al., 1999]. Tale modello è stato ampiamente utilizzato per predire il comportamento meccanico di elastomeri, i quali sono caratterizzati da un’elasticità di tipo entropico [Arruda and Boyce, 1993; Holzapfel, 2000]. Il modello predice l’allungamento della catena di polimero $x(F)$, conoscendo la lunghezza del

segmento di Kuhn α e la lunghezza del polimero steso o counter length L_c , in funzione della forza di stretching applicata secondo la seguente equazione:

$$x(F) = L_c \cdot \left[\coth\left(\frac{F \cdot a}{k_B \cdot T}\right) - \frac{k_B \cdot T}{F \cdot a} \right]$$

dove k_B è la costante di Boltzmann e T la temperatura assoluta. Questa equazione è solitamente scritta come $x(\beta) = L_c \cdot L(\beta)$, dove $L(\beta)$ è la funzione di Langevin e $\beta = F \cdot a / (k_B \cdot T)$, e non tiene conto del contributo entalpico dovuto allo stretching dei legami covalenti del backbone della catena polimerica.

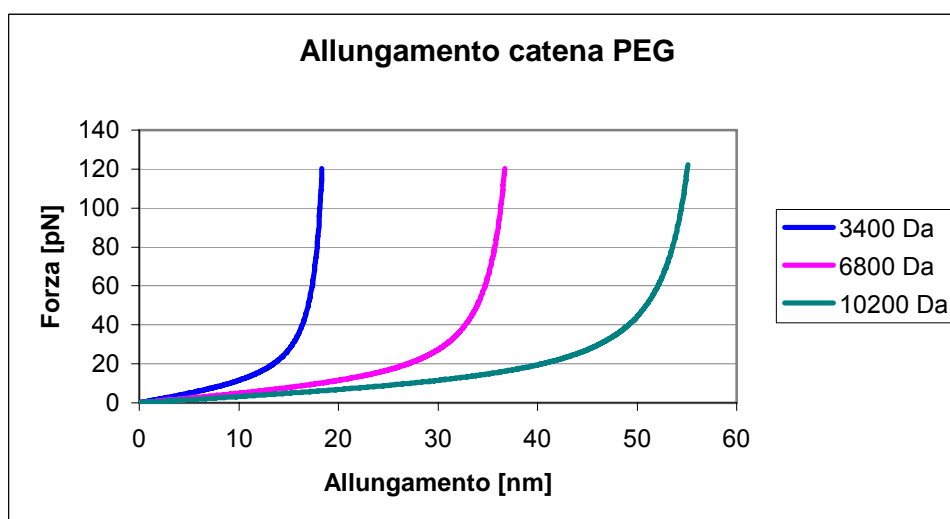


FIGURA 38. Diagramma dell'estensione di molecole di PEG di diversa lunghezza secondo l'FJC model.

Dal grafico di figura 38 si evince che, all'aumentare della lunghezza L_c della catena polimerica, si ottengono allungamenti della catena maggiori, a parità di forza applicata.

Se si considera l'ipotesi più favorevole, cioè un uguale numero di RGD correttamente esposti sulla superficie, la forza esercitata dal focal contact riesce a stendere sia la catena di PEG da 3400 Da che quella di PEG da 6800 Da. Tuttavia, la lunghezza della catena che rimane ancora da stendere risulta maggiore per la catena di PEG6800. Esisterà un valore soglia della forza di trazione cellulare, oltre il quale, la cellula non potrà più contrarre il proprio citoscheletro e, quindi, allungare la catena polimerica. Questo potrebbe essere sentito dalla cellula come una scarsa opposizione del substrato alla forza di trazione e, quindi, insufficiente alla formazione corretta dei focal contact. Verosimilmente questo è ciò che potrebbe accadere nel caso della catena di PEG a più alto peso molecolare. Tale ipotesi potrebbe essere avvalorata se si conoscesse l'effettivo numero di integrine attivate presenti nel singolo focal contact e, quindi, la forza di trazione complessiva.

Ciononostante, non si può escludere che la lunghezza maggiore della catena di polimero, trovandosi in soluzione acquosa nella configurazione “random coil”, possa mascherare il segnale RGD che si trova alla sua estremità. E ancora, sempre la catena più lunga potrebbe occupare una superficie maggiore e, quindi, legare meno segnali RGD sulla superficie trattata. In questi ultimi due casi, i risultati ottenuti sarebbero da attribuire alla minore esposizione e densità dei segnali adesivi, piuttosto che alla capacità di elongazione della catena di PEG.

Per quanto concerne l’adesione cellulare sugli idrogeli di PEG diacrilato, si è constatato che substrati più rigidi la favoriscono. Le cellule, infatti, aderiscono maggiormente sugli idrogeli al 10 e al 20% di PEG, i cui moduli elastici, è stato dimostrato, essere pari a 22 e 64 kPa rispettivamente. Al contrario su superfici meno rigide, idrogeli di PEG 5%, le cellule tendono ad aderire di meno e a non assumere la corretta morfologia appiattita. Questi dati sono avvalorati dalle osservazioni dell’organizzazione dei contatti focali e del citoscheletro sugli idrogeli di PEG (figure 33 e 34). Esiste, tuttavia, un valore ottimale di rigidità, oltre il quale le cellule non aderiscono più, come nel caso della matrice costituita da un idrogelo di PEG al 40% (modulo elastico 80 kPa). Tale valore ottimale si riconduce al fatto che le cellule tendono a rispondere meglio a substrati che ricordano maggiormente il tessuto di origine. Nel caso dei fibroblasti NIH3T3, il tessuto di origine è un tessuto connettivo embrionale, quindi “mediamente” rigido.

Anche per i segnali di adesione, esiste un valore ottimale di concentrazione che favorisce l’adesione cellulare. Tale concentrazione, però, varia al variare della rigidità del substrato. Per le matrici di PEG 5%, essa è pari a 0.5 mM, mentre per il PEG a 10 e 20% si sposta a 1 mM. L’orientazione dei segnali adesivi, infine, modula la risposta cellulare. Come evidenziato dai dati di adesione sui tre gradienti di RGD, le cellule sentono il gradiente e si allineano secondo questo, solo nel caso di 0÷5 mM RGD. Queste osservazioni sono in accordo con i risultati ottenuti anche da DeLong et al., 2005.

Per quanto riguarda la migrazione cellulare sugli idrogeli, il discorso risulta più complesso. Al contrario dell’adesione, il dominio in cui il fenomeno migratorio è osservabile è molto ristretto. Riguardo alla migrazione, quindi, il comportamento delle cellule sembra essere molto più selettivo: esiste un preciso valore della rigidità, o comunque un suo intorno molto ristretto, in corrispondenza del quale il substrato è giudicato adatto alla realizzazione del fenomeno migratorio. Il valore del modulo elastico E caratteristico del PEG3400 10%, calcolato con tests di compressione, è risultato essere pari a 22 kPa. Tale valore è considerato ideale per la migrazione cellulare anche in letteratura, ove è stato individuato mediante esperimenti condotti su substrati con gradienti di rigidità [Zaari et al., 2004].

Matrici relativamente più “soffici” (PEG 5%) o più rigide (PEG 20%), pur favorendo l’adesione cellulare, non risultano adatte alla migrazione, mentre idrogeli con caratteristiche molto diverse da quelle individuate come ottimali, scoraggiano anche l’attività adesiva (PEG 40%).

Si conferma, ancora una volta, il ruolo fondamentale svolto dall’RGD nel condizionare la migrazione cellulare: anche in corrispondenza del substrato ottimale (PEG 10% wt), infatti, si è reso necessario individuare un suo preciso valore di concentrazione (5 mM), affinché le cellule potessero migrare (tabella 2) (evento non verificatosi, invece, su idrogeli di pari rigidità, ma con RGD in concentrazione inferiore, 1 mM).

Bisogna considerare, infine, che il processo di migrazione cellulare, essendo molto più complesso di quello di adesione, richiede una combinazione di più fattori, quali la rigidità del substrato e la distribuzione dei segnali, ma anche le modifiche del microambiente che le cellule circostanti possono apportare localmente. E’ stato dimostrato, infatti, che le cellule esercitando forze di tensione sul substrato possono modificare le proprietà meccaniche locali e, quindi, la rigidità. Le cellule vicine risentono di questa modifica e rispondono ad essa migrando oppure inibendo tale processo [Min Lo et al., 2000].

-CAPITOLO 6-
RISPOSTA CELLULARE A MATERIALI NANOMETRICI
VALUTAZIONE DELL'UPTAKE DI
NANOPARTICELLE DI POLISTIRENE DA PARTE DI
CELLULE ENDOTELIALI

INTRODUZIONE

Le nanoparticelle possono essere impiegate per numerose applicazioni biomediche: in diagnostica, come mezzi di contrasto per la risonanza magnetica; in terapia, nei sistemi di drug delivery, gene therapy, ed ipertermia. Per ognuna di queste applicazioni, il meccanismo di azione delle nanoparticelle richiede un riconoscimento specifico del tessuto bersaglio con la conseguente formazione di un flusso attraverso la membrana che riveste le cellule. Sia il meccanismo di riconoscimento che il processo mediante il quale si realizza il flusso transmembrana di nanoparticelle sono tuttora poco chiari. Ancora molto, infatti, c'è da capire su come materiali non biologici, quali quelli di cui sono composte le nanoparticelle, possano realizzare questo flusso di transmembrana.

I meccanismi, che permettono il passaggio dei materiali biologici attraverso la membrana, sono molto differenti. Comunque, alla base dei meccanismi d'internalizzazione vi è, certamente, un'interazione tra la cellula e il materiale biologico esogeno. La cellula, infatti, riconosce specificamente le macromolecole biologiche, mediante recettori e le internalizza. Nel caso delle nanoparticelle, le cellule non posseggono sulla loro superficie dei recettori specifici, per tale motivo, i parametri coinvolti possono essere altri, ad esempio, il tipo di materiale con il quale sono realizzate, le proprietà di superficie, quale la carica, per prevenire l'opsonizzazione, ecc.

Risulta evidente la necessità di caratterizzare i meccanismi che consentono la realizzazione di questo flusso di transmembrana, ma al tempo stesso è necessario riuscire a stimare la quantità di nanoparticelle che, riuscendo a superare la membrana cellulare, si trovano all'interno delle cellule. Non è ancora nota, infatti, l'esatta proporzione fra il numero di nanoparticelle depositate e quello di nanoparticelle assorbite. Per le nanoparticelle utilizzate come mezzi di contrasto, sarebbe utile conoscere la concentrazione ottimale da impiegare per effettuare l'analisi diagnostica, oppure, nel caso di nanoparticelle usate per i sistemi di rilascio controllato di farmaci bisognerebbe riuscire a stabilire la dose soglia alla quale le nanoparticelle risultano efficaci. Questo tipo di analisi quantitativa incontra, però, molteplici difficoltà a causa delle ridotte dimensioni delle nanoparticelle (inferiori ad 1 μm e normalmente al di sotto dei 500 nm).

La rilevazione di grandezze nanometriche richiede, infatti, l'utilizzo di opportune apparecchiature e di particolari metodiche di analisi.

A tal scopo in questo lavoro si è voluto mettere a punto una tecnica di analisi per rilevare e quantizzare l'internalizzazione di nanoparticelle in un sistema biologico in vitro.

Come modello sperimentale sono state utilizzate nanoparticelle di polistirene rodamate, con diametri di 49 e 200 nm. La presenza del fluorocromo rodamina ha permesso la visualizzazione delle nanoparticelle al microscopio confocale. Inoltre l'utilizzo di nanoparticelle di dimensioni diverse ha permesso di valutare anche l'effetto delle dimensioni sull'internalizzazione cellulare.

Per la realizzazione degli esperimenti è stata usata una linea di cellule endoteliali porcine, PAE. Tali cellule in vivo costituiscono il tessuto endoteliale, il quale funge da rivestimento dei vasi sanguigni, e per questo, è uno dei primi tessuti, insieme al tessuto epiteliale, che va ad interagire con le nanoparticelle.

L'internalizzazione delle nanoparticelle rodamate è stata valutata in termini qualitativi e quantitativi. L'analisi qualitativa è stata effettuata acquisendo le immagini mediante un microscopio confocale, di cellule esposte a tempi diversi (1 h e 3 h) con nanoparticelle di 49 e 200 nm di diametro. Le immagini ottenute sono state ulteriormente analizzate con il software Metamorph, per determinare le dimensioni ed il numero di aggregati di nanoparticelle nelle cellule.

L'analisi quantitativa è stata condotta con uno spettrofluorimetro che ha permesso di determinare il numero di nanoparticelle internalizzate.

MATERIALI E METODI

1 Colture cellulari

Per realizzare gli esperimenti sono state usate cellule endoteliali porcine stabilizzate (PAE). Le cellule PAE sono mantenute in coltura in terreno Ham's F12 (Gibco) supplementato con 10% di siero fetale bovino (FBS) (Gibco), glutamina 1× (Gibco) e penicillina/streptomina 1× (Gibco), coltivate in piastre Petri da 10 mm di diametro e cresciute in condizioni di temperatura (37 °C), CO₂ (5 %) e umidità controllate in incubatore.

Le cellule crescono adese alla superficie della piastra di coltura. Al raggiungimento dello stato di confluenza, le cellule sono state passate 1:7 ed il terreno cambiato ogni tre giorni.

2 Nanoparticelle utilizzate

Per il seguente studio sono state usate delle nanoparticelle di polistirene (Duke Scientific Corporation) (figura 1). Si tratta di nanoparticelle commerciali e biocompatibili usate per citofluorimetria.

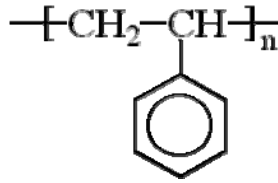


FIGURA 1. Composizione chimica del polistirene.

Le nanoparticelle sono marcate con la rodamina, un fluorocromo che permette la loro visualizzazione al microscopio confocale.

Per l'esperimento si sono usate nanoparticelle aventi diametri rispettivamente di 49 nm e 200 nm.

Prima di effettuare gli esperimenti le nanoparticelle sono state filtrate con dei filtri del diametro di 0,22 μm , per allontanare eventuali agenti contaminanti.

La sospensione nanoparticellare di partenza ha una concentrazione 1% solido/liquido. In particolare si ha che il numero di nanoparticelle/ml per quelle di 49 nm è $1,5 \times 10^{14}$, e per quelle di 200 nm è di $2,3 \times 10^{13}$.

3 Esperimento d'internalizzazione per l'analisi qualitativa

Per la realizzazione dell'esperimento d'internalizzazione sono state seminate 5×10^4 cellule su dei vetrini copri-oggetto da 12 mm di diametro, posti sul fondo di un pozzetto di una multiwell da 24. Successivamente le sospensioni di partenza di nanoparticelle sono state diluite in modo da ottenere una concentrazione di $0,21 \times 10^{12}$ NPs/ml.

Per le diluizioni è stato usato il terreno privo di rosso fenolo, un indicatore di pH. Il rosso fenolo cambia colore quando il terreno di coltura, a contatto con l'aria e con la CO_2 , acidifica. Per realizzare l'esperimento si è preferito usare del terreno privo di rosso fenolo, per eliminare la fluorescenza intrinseca di quest'ultimo che avrebbe potuto compromettere la successiva osservazione al microscopio confocale.

- Prelevato il terreno di coltura dalle cellule, si è aggiunto 1 ml di sospensione e si è lasciato nell'incubatore per 1 h e per 3 h.
- Dopo 1 h si è aspirato il terreno con le nanoparticelle e sono stati effettuati due lavaggi con PBS, per rimuovere le nanoparticelle che non erano entrate nelle cellule.
- Sono state fissate le cellule con la paraformaldeide al 4%. Trascorsi 20 minuti si aspira la paraformaldeide e si effettuano due lavaggi con PBS per eliminare i residui ancora presenti.

- Al fine di localizzare le cellule anche in fluorescenza, ne sono stati colorati i nuclei con l'HÖECST. Le cellule sono state incubate per 5 minuti a temperatura ambiente con 1 ml di una soluzione di HÖECST in PBS (1:20). Trascorsi i 5 minuti sono stati realizzati 2 lavaggi con PBS.
- Allo scadere delle 3 h d'incubazione è stato ripetuto lo stesso procedimento per i rimanenti campioni.
- L'ultimo passo prima dell'osservazione al confocale consiste nel montaggio dei vetrini copri-oggetto su dei vetrini porta oggetto, tramite l'uso di una soluzione di PBS: glicerolo = 1:1.

4 Acquisizione delle immagini al CLSM

Le immagini sono state acquisite con un microscopio confocale LSM 512 Zeiss. Per l'acquisizione delle immagini è stato usato come obiettivo il 40× ad olio, ed il laser a HeNe1 (elio-neon) con $\lambda = 543$ nm. Si usa tale laser per poter eccitare la rodamina. Le immagini sono state acquisite a fluorescenza, a trasmissione e nella configurazione multitrack che permette di acquisire contemporaneamente sia a trasmissione che a fluorescenza, e di effettuare una sovrapposizione delle immagini (figura 2). In questo modo è stato possibile visualizzare i confini della cellula entro i quali erano racchiuse le nanoparticelle. Per ogni immagine acquisita, è stato utilizzato lo stesso set di parametri. Le immagini sono state salvate nel formato .lsm e, successivamente, esportate con l'estensione .tif, per consentire la loro successiva elaborazione con il software Metamorph.

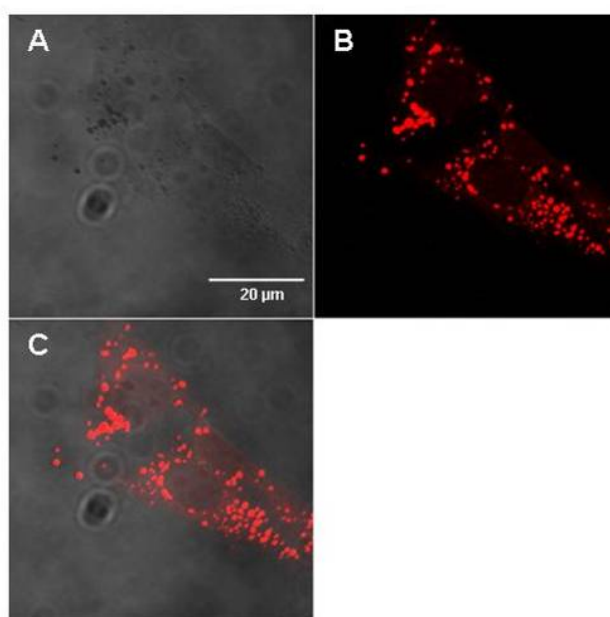


FIGURA 2. Immagine acquisita, al microscopio confocale, nella configurazione multitrack. Permette di acquisire sia a trasmissione (A) che a fluorescenza (B), e di effettuare una sovrapposizione delle immagini (C).

5 Analisi qualitativa delle immagini con il software Metamorph

L'analisi delle immagini consiste nell'estrazione delle informazioni necessarie da determinate immagini. Si basa sulla possibilità di formulare una rappresentazione matematica della distribuzione di luminosità di un'immagine.

Un'immagine può essere definita come una funzione bidimensionale $f(x,y)$ con x ed y coordinate spaziali ed $f(x,y)$ ampiezza della funzione (intensità, livello di grigio dell'immagine nel punto). Quando x , y ed f sono quantità discrete finite, l'immagine è chiamata immagine digitale e può essere elaborata.

Per realizzare l'analisi delle immagini, è stato utilizzato il software Metamorph. Sull'immagine da analizzare sono stati tracciati i confini della cellula, seguendo il loro andamento grazie alle immagini, acquisite al microscopio confocale, con la configurazione multitrack (figura 3).

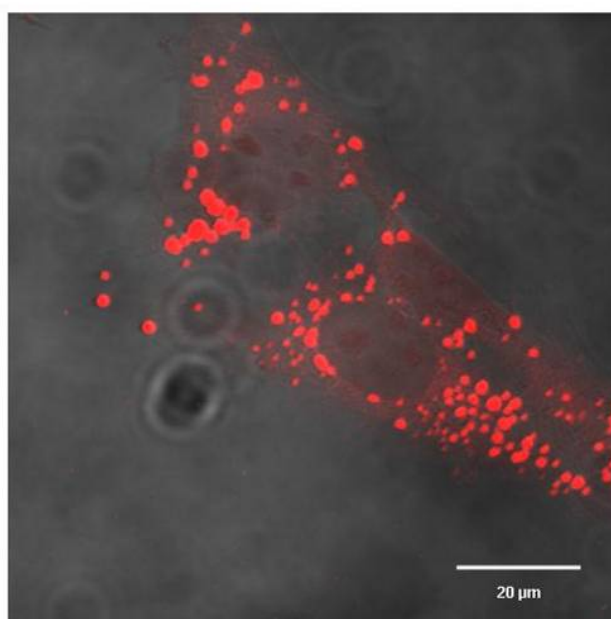


FIGURA 3. Immagine acquisita al microscopio confocale secondo la configurazione multitrack (merge).

Una volta definiti i confini della cellula, è stato necessario realizzare una calibrazione delle immagini, per convertire i pixels in μm . Settata l'unità di misura, questa è stata applicata ad ogni immagine che veniva analizzata, tramite il comando *measure* e la funzione *calibrate distance*.

Per effettuare l'analisi, le immagini RGB (figura 4 A), acquisite al microscopio confocale, sono state trasformate in immagini in scala di grigio (figura 4 B), grazie alla funzione *mono*,

prima di essere esportate. L'utilizzo di immagini in scala di grigio è stata utile per semplificare l'operazione del threshold.

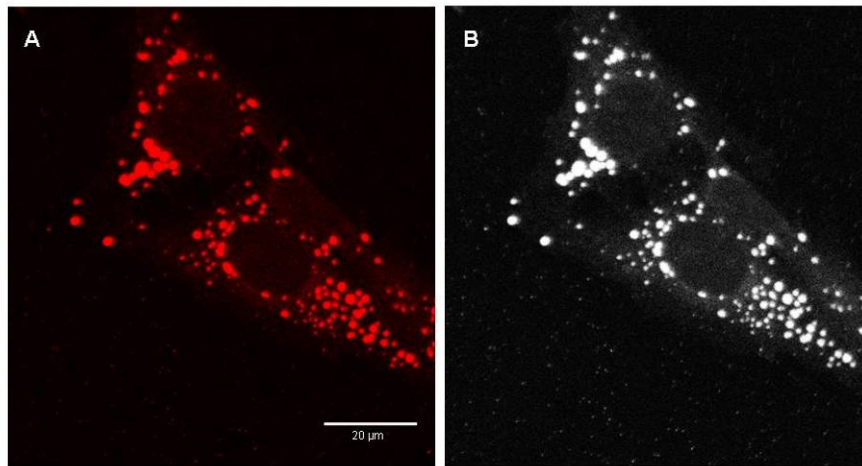


FIGURA 4. Immagine RGB (A) e in scala di grigio (B).

In seguito al processo di acquisizione dell'immagine si effettuano dei miglioramenti, questa fase viene chiamata pre-elaborazione. Il miglioramento della qualità delle immagini consiste nella riduzione del rumore, nella modifica della dinamica dei livelli di intensità per miglioramento del contrasto e nell'eliminazione di deformazioni geometriche. Il passo successivo, quindi, è stato quello di applicare la funzione *threshold image* (figura 5). Il threshold è il processo di decidere se un pixel è parte di un "oggetto" che deve essere misurato o processato, o è semplicemente parte del fondo e, quindi, deve essere escluso dall'analisi. Questo processo generalmente usa l'intensità del pixel per prendere la decisione. Ad esempio, è possibile segmentare l'immagine, selezionando un threshold superiore ed inferiore, per definire un intervallo di livelli della scala di grigio accettabili, e il processore dell'immagine raggruppa tutti i pixels contigui che cadono in quell'intervallo, "oggetto". Il threshold di un'immagine (o segmentazione) definisce "oggetti" da misurare e li estrae (segmenta) dal fondo.

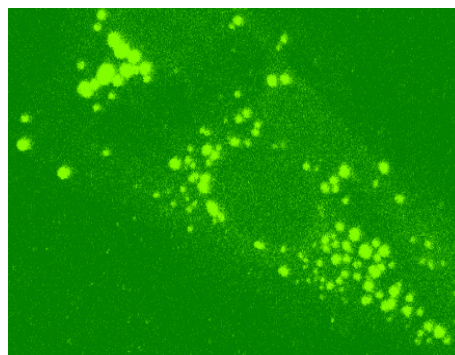


FIGURA 5. Threshold dell'immagine analizzata.

Dal menù principale tramite il comando *measure* che contiene in *morphometry* la funzione *show individual object data* è stato creato un file in cui sono stati inseriti i dati di ogni immagine analizzata (figura 6).

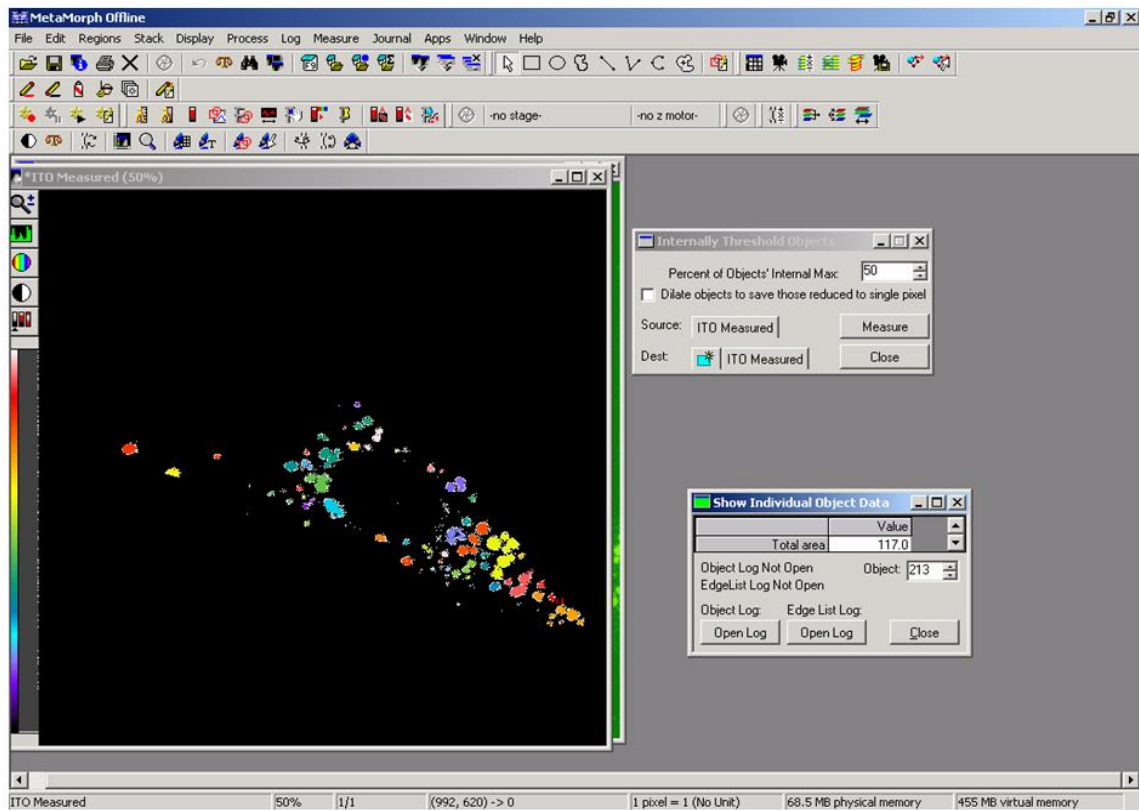


FIGURA 6. Finestra dei comandi del Metamorph.

Una volta creato il file in cui inserire i dati dell'immagine, dal comando *morphometry* si è scelta la funzione *internally threshold object* per effettuare la conta e valutare le dimensioni degli aggregati, visualizzando le differenti aree con un'immagine in pseudocolor (figura 7). L'analisi delle immagini è stata realizzata per cellule considerate a vari intervalli temporali (1 e 3 h).



FIGURA 7. Immagine analizzata.

Una volta realizzata l'analisi dell'immagine considerata tramite il comando *log*, presente nel menù principale, e la funzione *close data log*, è stato possibile chiudere definitivamente il file. I file sono stati automaticamente salvati dal Metamorph con l'estensione .log.

Per poter visualizzare le aree su ogni cellula, e quindi salvare una nuova immagine che le contenesse, è stato usata, tramite il comando *edit*, la funzione *duplicate*.

Infine per poter visualizzare, e quindi passare ad un'analisi più approfondita dei dati è stato necessario trasformare i file .log in file excel.

6 Esperimento d'internalizzazione per l'analisi quantitativa

Per realizzare l'esperimento sono state seminate, in ognuno dei 6 piastroni necessari, $3,83 \times 10^6$ cellule PAE. Successivamente le sospensioni di partenza di nanoparticelle sono state diluite in modo da ottenere una concentrazione di $0,21 \times 10^{12}$ NPs/ml.

Per le diluizioni è stato usato un terreno DMEM con 10% di FBS inattivato.

- 20 ml di sospensione nanoparticellare sono stati aggiunti alle cellule in piastra e lasciati in incubatore per 1 h e per 3 h.
- Dopo 1 h è stato aspirato il terreno con le nanoparticelle e sono stati effettuati dei lavaggi con PBS, per eliminare le nanoparticelle che non erano state internalizzate.
- Per dissociare il monostrato è stato necessario un trattamento proteolitico. Realizzato ponendo 2 ml di tripsina per piastra e lasciandola agire, nell'incubatore, per circa 5 minuti, fin quando, cioè, le cellule non si erano completamente staccate dal fondo della piastra.
- Trascorsi i 5 minuti, le cellule sono state raccolte con 8 ml di PBS e poste in tubi da 15 ml.

- Si è poi centrifugato per eliminare la tripsina ancora presente. Dopo aver centrifugato per 10 minuti a 2000 rpm, si è venuto a formare un pellet di cellule. Dalle provette si è, quindi, aspirato il PBS di coltura senza staccare il pellet.
- Si è risospeso il pellet in 500 μ l di Lysis Buffer e si è lasciato agire per 1 h a temperatura ambiente. Il Lysis Buffer, composto essenzialmente da un detergente, riesce a rompere le membrane lipidiche e a liberare il contenuto cellulare e quindi, con esso, anche le nanoparticelle che, si trovano all'interno della cellula. La molecola dei saponi, e quindi del Lysis Buffer, ha una testa idrofila ionizzata negativamente ed una coda idrofoba. Le sue molecole sono, pertanto, in grado di emulsionare le sostanze grasse, consentendone l'allontanamento con l'acqua.

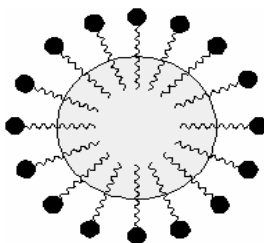


FIGURA 8. Rappresentazione grafica di una micella.

Le code delle molecole di sapone si sciolgono nella massa della sostanza grassa, che viene circondata formando una micella (figura 8). Dato che tutte le teste delle molecole di sapone recano una carica negativa, la repulsione elettrostatica impedisce alle micelle di ri-aggregarsi e le mantiene in sospensione nell'acqua.

- Allo scadere delle 3 h di incubazione si ripete lo stesso procedimento per i rimanenti campioni.
- L'ultimo passo prima della lettura allo spettrofluorimetro consiste nel sonicare per 5 minuti. Sonicare significa utilizzare onde sonore, prodotte da un bagno ad ultrasuoni, ad alta frequenza (40 kHz) che producono all'interno della vasca un effetto di cavitazione che dà origine a milioni di bolle microscopiche a bassa pressione, queste ultime, consentono il disaggregamento degli agglomerati di materiale che possono essere presenti nei campioni.

7 Acquisizione dei dati con lo spettrofluorimetro

Il primo passo, per l'acquisizione dei dati, è stato quello di realizzare le rette di calibrazione tramite l'utilizzo di concentrazioni note di nanoparticelle di 49 e 200 nm. Per la lettura dei campioni è stato usato il protocollo rhodamine già presente nel software dello strumento (figura 9).

Protocol name Rhodamine
 Protocol number N/A
 Name of the plate type OptiPlate 96
 Number of wells in the plate 8 X 12
 Height of the plate 14.6 mm
 Offset of the wells 11.240 mm, 14.380 mm
 Distance between wells 9.000 mm, 9.000 mm
 Number of repeats 1
 Delay between repeats 0 s
 Measurement height 8.00 mm
 Label technology Prompt fluorometry
 CW-lamp filter name PF540
 CW-lamp filter slot A7
 Emission filter name Copy of D572
 Emission filter slot A4
 Measurement time 0.1 s
 Emission aperture Normal
 CW-lamp energy 30445
 Second measurement CW-lamp energy . 0
 Emission side Above
 CW-Lamp Control Stabilized Energy
 Excitation Aperture N/A

FIGURA 9. Protocollo spettrofluorimetro.

Lo spettrofluorimetro (Wallac 4210, Perkin Elmer) ha fornito i valori di intensità di fluorescenza relativi ai campioni considerati. I dati ottenuti sono stati salvati in un file excel.

Per determinare il numero di nanoparticelle, contenuto all'interno delle concentrazioni note, è bastato moltiplicare il valore delle concentrazioni (numero di NPs/ml) per il volume considerato nella realizzazione dell'analisi. Anche quest'ultimo, infatti, risultava noto e pari a 200 µl.

Le rette di calibrazione sono state ottenute interpolando i punti dell'asse delle ascisse, che contenevano i valori della fluorescenza, con quelli delle ordinate, in cui è stato inserito il numero di nanoparticelle contenuto nei vari campioni analizzati. Tramite excel sono state ricavate le equazioni delle due rette.

$$y = 7,28 \cdot 10^6 x - 2,61 \cdot 10^9 \quad (\text{equazione retta } 49 \text{ nm})$$

$$y = 1,810 \cdot 10^5 x - 2,109 \cdot 10^8 \quad (\text{equazione retta } 200 \text{ nm})$$

In cui:

- La y restituisce il numero di nanoparticelle contenuto nel singolo volume analizzato.

- La x indica l'intensità di fluorescenza misurata dallo spettrofluorimetro per il singolo campione.

I grafici ottenuti contenenti le rette di calibrazione, rispettivamente a 49 e 200 nm, sono riportati di seguito (figura 10).

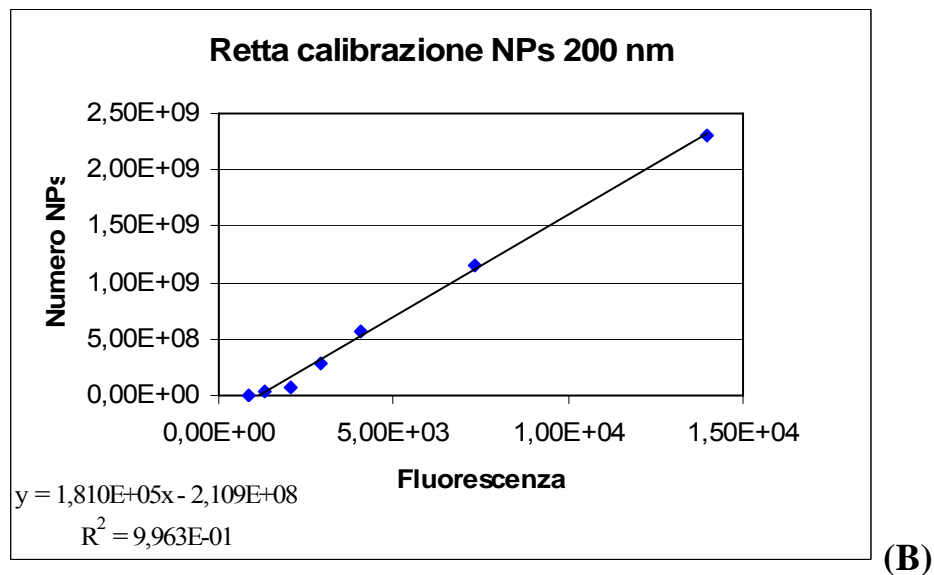
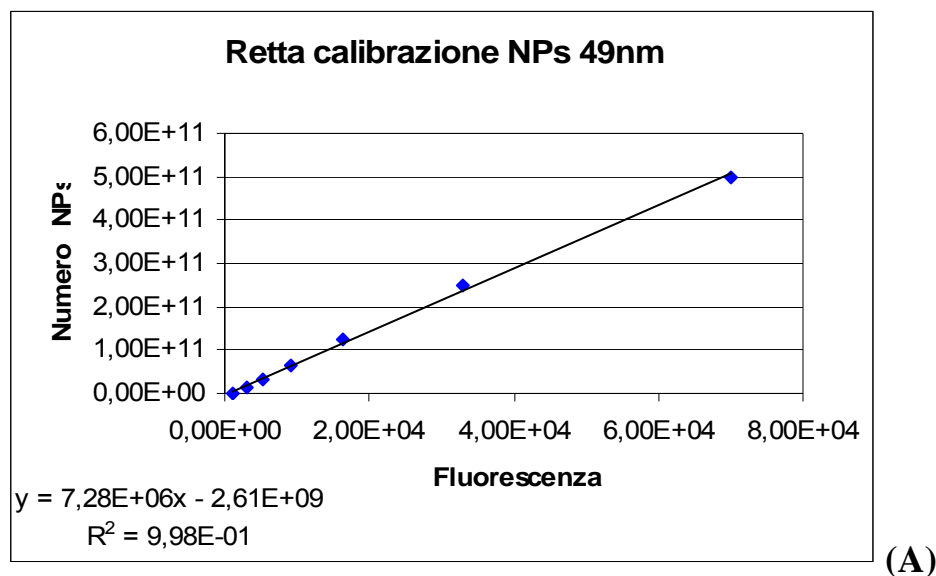


FIGURA 10. Rette di calibrazione dello spettrofluorimetro. La figura (A) è relativa alle nanoparticelle di 49 nm, mentre la retta (B) è relativa alle nanoparticelle di 200 nm.

Dopo la realizzazione delle rette di calibrazione lo spettrofluorimetro è stato usato per un'analisi quantitativa delle nanoparticelle rodaminate presenti nei campioni preparati seguendo il protocollo precedentemente descritto. L'analisi si è basata sull'esame dello spettro della luce emessa per fluorescenza. L'intensità di fluorescenza dipende, infatti, dalla

quantità di sostanza presente nella soluzione e quindi è stato possibile risalire alla quantità stessa di nanoparticelle rodamate contenute nei campioni analizzati. L'analisi allo spettrofluorimetro è stata realizzata separatamente per la fase liquida e per la fase viscosa, che si era venuta a formare, in ogni campione, a seguito dell'esperimento.

Dai campioni preparati, lo spettrofluorimetro ha fornito il valore dell'intensità di fluorescenza emesso dalla rodamina e che sono stati salvati in excel.

Grazie allo spettrofluorimetro e alle rette di calibrazione, è stato possibile risalire al numero di nanoparticelle contenuto nelle concentrazioni analizzate sia per la fase liquida che per la fase viscosa. Per determinare il numero di nanoparticelle contenuto nella singola cellula sono stati sommati i valori relativi al numero di nanoparticelle della fase liquida con quelli della fase viscosa. Tale valore è stato poi diviso per il numero totale di cellule piastrate il quale, risultava essere noto e pari a $3,83 \cdot 10^6$.

Ovvero secondo la seguente formula si può ricavare il numero di nanoparticelle internalizzate da una singola cellula:

$$\frac{\text{Numero NPs (fase liquida)} + \text{Numero NPs (fase viscosa)}}{\text{Numero cellule piastrate}}$$

RISULTATI

1 Risultati analisi qualitativa

Con l'obiettivo di riuscire a valutare la quantità di nanoparticelle che, riuscendo a superare la membrana cellulare, si trovano nelle cellule è stata effettuata una duplice analisi in termini qualitativi e quantitativi. L'analisi qualitativa è stata effettuata acquisendo le immagini con un microscopio confocale.

Dalle immagini delle cellule PAE, incubate per 1 h e per 3 h con nanoparticelle di 49 nm e 200 nm di diametro, è stato possibile osservare che le nanoparticelle attraversano le membrane e si trovano all'interno delle cellule, come confermato dalle sezioni lungo l'asse z delle cellule ottenute mediante la funzione z-stack del microscopio confocale. (figura 11 A e B).

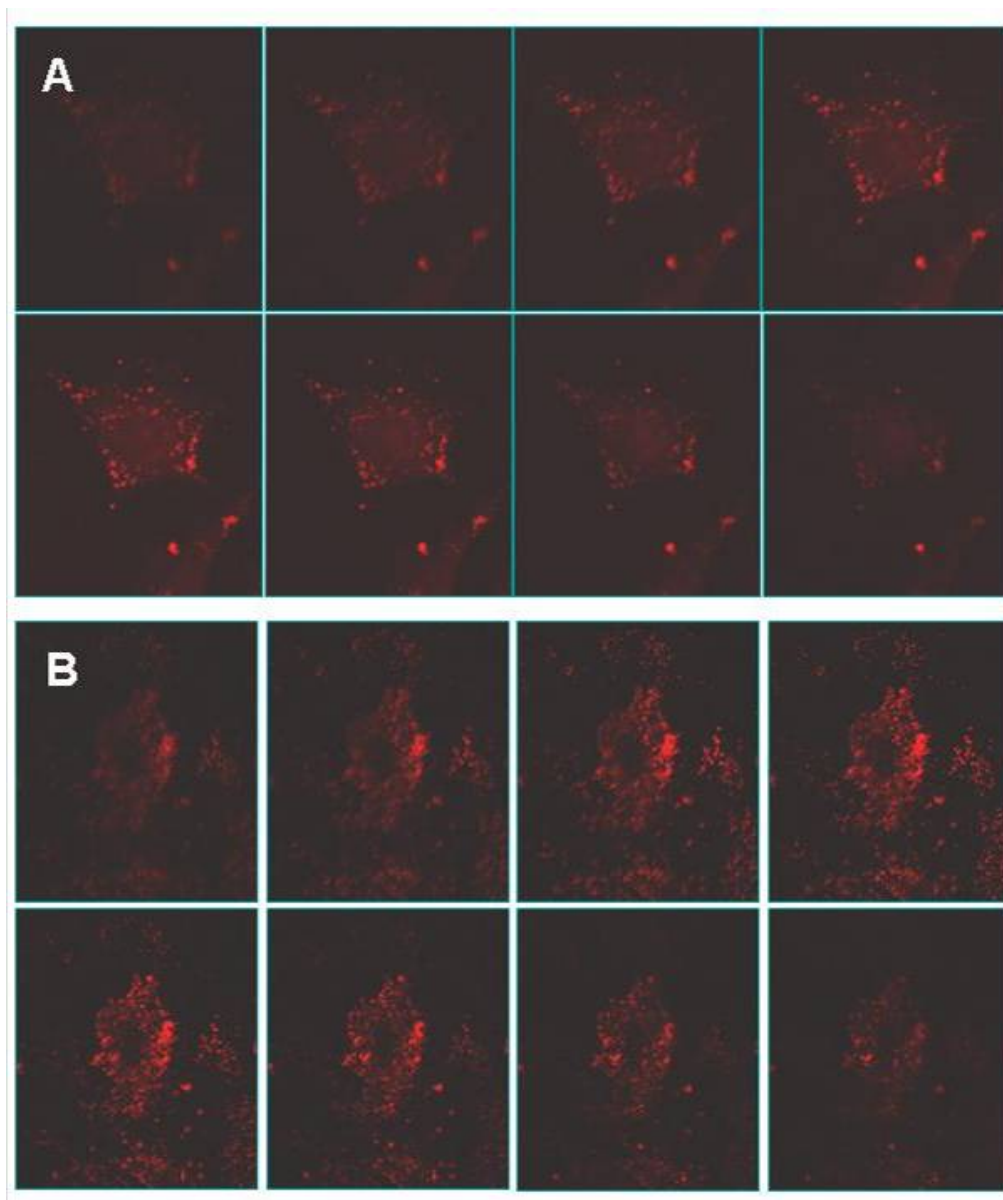


FIGURA 11. Immagini acquisite al microscopio confocale con la funzione Z-STACK (A) 49 nm (B) 200 nm.

La distribuzione delle nanoparticelle all'interno delle cellule non è omogenea: sono localizzate preferenzialmente nel citoplasma e formano aggregati (figura 12).

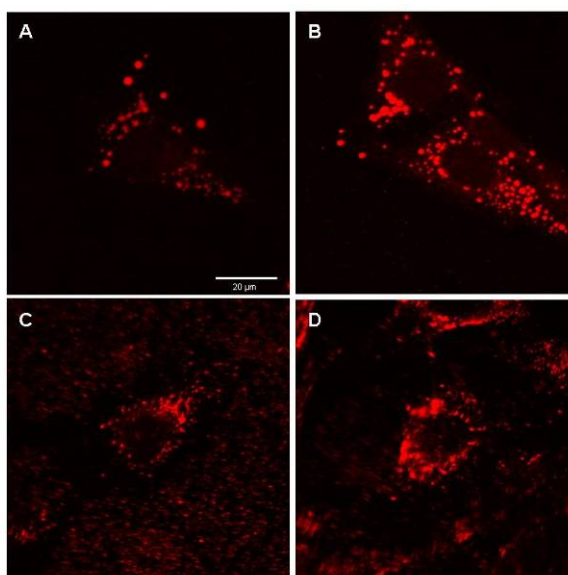


FIGURA 12. Immagini acquisite al microscopio confocale: (A) 49 nm 1h, (B) 49 nm 3h, (C) 200 nm 1h e (D) 200 nm 3h.

Per valutare le dimensioni il numero e degli aggregati che si sono formati all'interno delle cellule è stata effettuata un'analisi delle immagini grazie al software Metamorph.

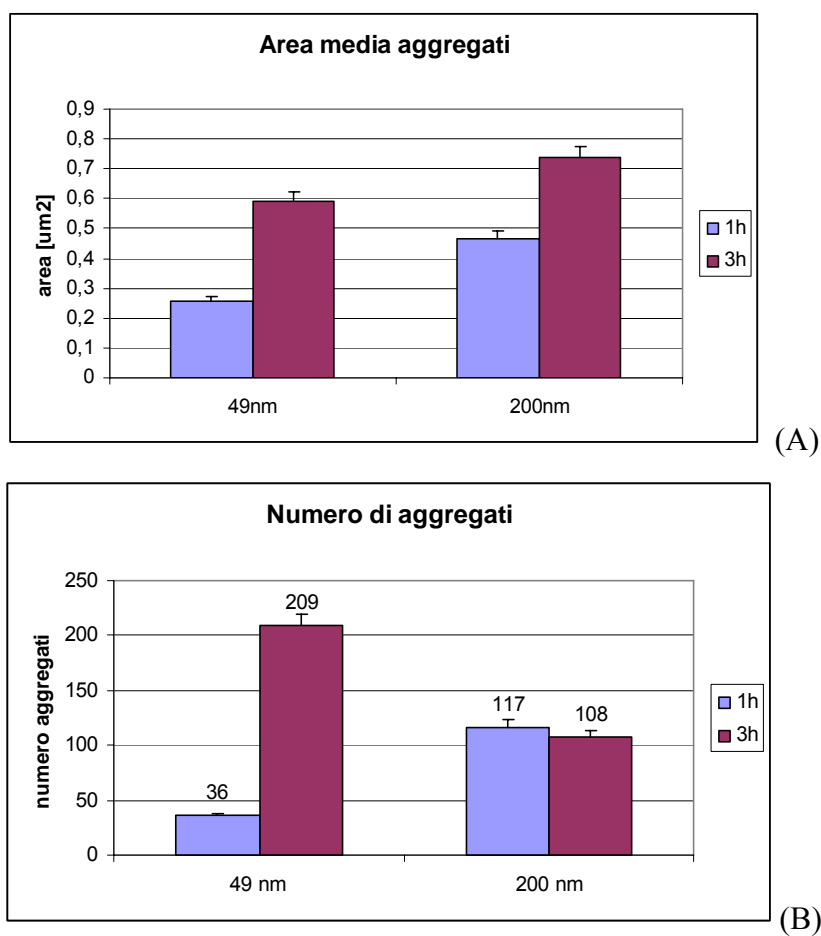


FIGURA 13. Risultati dell'analisi qualitativa: (A) area media aggregati, (B) numero aggregati.

Come si può osservare dall' istogramma (A) della figura 13, il valore dell'area media degli aggregati nel tempo aumenta sia per le nanoparticelle di 49 nm che per quelle di 200 nm. Infatti, ad 1h tale valore risulta essere inferiore rispetto a quello che si può osservare a 3h.

Per le nanoparticelle di 49 nm, l'area media degli aggregati a 3 h si triplica rispetto al valore relativo ad 1h (figura 13 A). Nel contempo, quello che si può osservare, facendo riferimento al numero di aggregati che si vengono a formare, è che questi aumentano notevolmente di numero a 3 h rispetto al numero che si osserva ad 1 h.

Anche per le nanoparticelle di 200 nm, nel tempo, si può osservare un aumento dell'area media degli aggregati, mentre il numero degli aggregati resta per lo più costante. Il valore relativo all'area media dopo 3 h è pari a circa il doppio di quello osservabile ad 1 h.

Un numero pressoché costante di aggregati per le nanoparticelle di 200 nm, associato ad un aumento dell'area media degli aggregati, lascia pensare che le nuove nanoparticelle internalizzate dopo 3 h non vadano a formare dei nuovi aggregati, ma che vadano ad accrescere quelli già presenti all'interno della cellula.

Invece, un numero notevolmente maggiore di aggregati di nanoparticelle di 49 nm dopo 3 h, rispetto a quello osservabile dopo 1 h, associato, anch'esso ad un aumento dell'area media degli aggregati, porterebbe a pensare che le ulteriori nanoparticelle internalizzate nel tempo vadano a formare dei nuovi aggregati. Le dimensioni degli aggregati a 49 nm sono, infatti, inferiori rispetto a quelle delle nanoparticelle di 200 nm, tale dato si ripropone sia ad 1 h che a 3 h.

2 Risultati analisi quantitativa

La necessità di passare ad un'analisi quantitativa è stata dettata dall'impossibilità di ricavare il numero di nanoparticelle dall'analisi delle immagini realizzata con il software Metamorph.

Con lo scopo di raggiungere l'obiettivo di quantizzare il numero di nanoparticelle capaci di attraversare la membrana cellulare, è stata, quindi, effettuata un'analisi spettrofluorimetrica sui lisati cellulari ottenuti da cellule trattate con nanoparticelle di 49 e 200 nm di diametro ad 1 h e a 3 h.

Grazie allo spettrofluorimetro, infatti, si sono potute ottenere le rette di calibrazione per le nanoparticelle di 49 e 200 nm e, inoltre, i valori d'intensità di fluorescenza relativi ai campioni da analizzare. Da questi due dati, si è potuto risalire al valore totale di nanoparticelle internalizzate in una singola cellula.

Nel momento in cui è stato necessario trasferire i campioni realizzati nelle apposite micropiastre, utili per effettuare la lettura allo spettrofluorimetro, si è potuta osservare la presenza di una duplice fase all'interno dei campioni realizzati, secondo il protocollo precedentemente descritto, una prima fase viscosa e una seconda fase liquida. La fase viscosa è riconducibile ai resti delle membrane cellulari e delle membrane che costituiscono gli organelli intracitoplasmatici. La fase liquida, invece, comprende il citosol, in cui è disciolto il materiale intracellulare libero.

Grazie alla netta distinzione tra la fase viscosa e la fase liquida, le misure sono state realizzate separatamente per l'una e per l'altra.

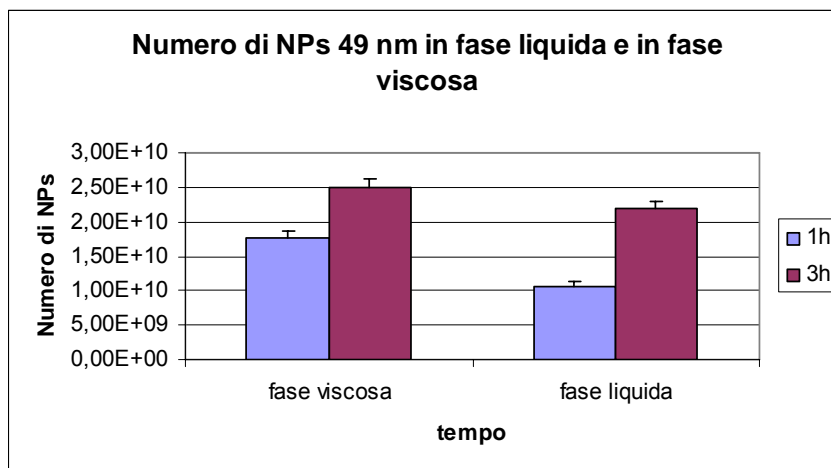
Dalla lettura dello spettrofluorimetro si è potuto osservare una maggiore intensità di fluorescenza emessa dai campioni della fase viscosa rispetto a quelli della fase liquida, probabilmente, poiché una maggiore quantità di nanoparticelle è rimasta intrappolata all'interno delle membrane cellulari, che costituiscono le vescicole endocitiche.

Nel controllo, privo di nanoparticelle, i valori di intensità di fluorescenza sono notevolmente più bassi rispetto alle letture realizzate con i campioni di 49 e di 200 nm. Il valore di intensità di fluorescenza riscontrato nel controllo è associato alla fluorescenza cellulare intrinseca dovuta ad alcune macromolecole, presenti all'interno delle cellule, che sono autofluorescenti. Per i campioni di 49 nm, i valori d'intensità di fluorescenza risultano essere più bassi rispetto a quelli di 200 nm (tabella 1).

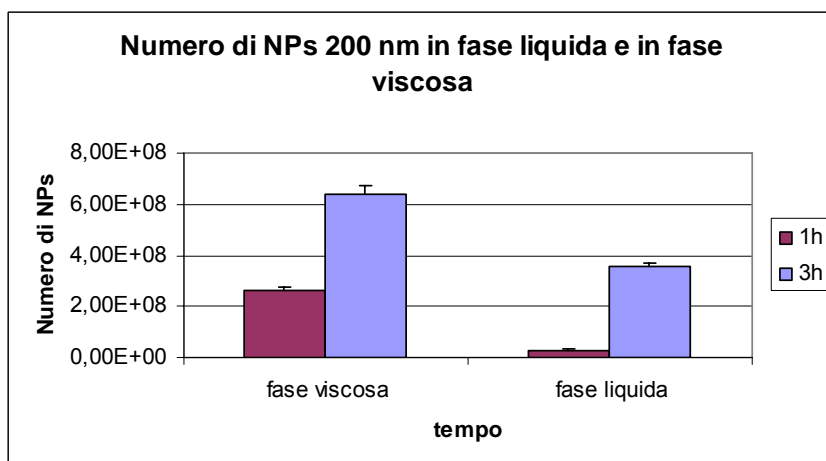
Controllo		NP 49 nm		NP 200 nm		
1 h	3 h	1h	3 h	1h	3h	
1864	1108	2964	3979	2541	4625	Intensità di fluorescenza della fase viscosa
576	855	1960	3556	1266	3062	Intensità di fluorescenza della fase liquida

Tabella 1. Risultati spettrofluorimetro.

Sostituendo la x nelle equazioni delle rette di taratura, con i valori d'intensità di fluorescenza ottenuti, si è risalito al numero di nanoparticelle contenuto nella fase viscosa e in quella liquida (figura 14).



(A)



(B)

FIGURA 14. Numero di nanoparticelle in fase liquida e in fase viscosa, in (A) per le nanoparticelle di 49 nm, in (B) per quelle di 200 nm.

Conoscendo il numero di cellule piastrate, si è potuto risalire al numero di nanoparticelle internalizzate da una singola cellula (figura 15).

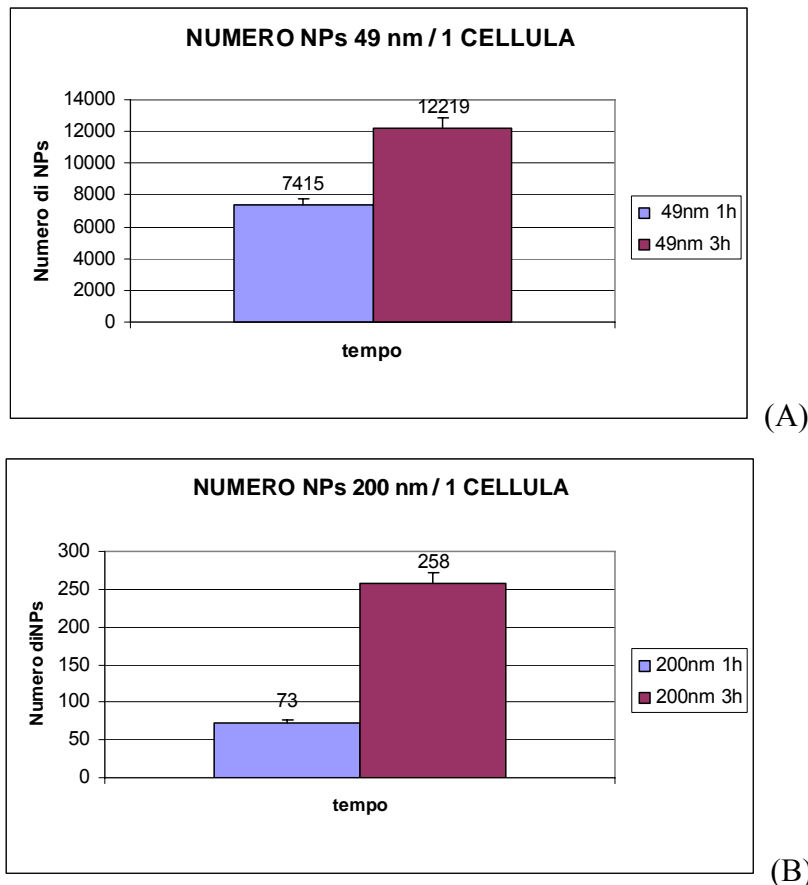


FIGURA 15. Numero di nanoparticelle internalizzate in una cellula a 49 nm (A) e a 200 nm (B).

Si può osservare, dai risultati ottenuti, che le nanoparticelle di 49 nm vengono internalizzate in quantità maggiore rispetto a quelle di 200 nm (figura 15 A-B). L'ordine di grandezza che si ricava per le nanoparticelle di 49 nm è, infatti, due volte maggiore rispetto alle nanoparticelle di 200 nm.

Inoltre, come si può notare dai grafici, all'aumentare del tempo di esposizione delle cellule alle nanoparticelle, aumenta il valore di nanoparticelle internalizzato. Il flusso transmembranale di nanoparticelle è, quindi, tempo dipendente.

In particolare, per le nanoparticelle di 49 nm, la quantità internalizzata si raddoppia nel tempo. Se, infatti, a 1 h questa è pari a 7415 nanoparticelle internalizzate, dopo 3 h si porta a 12219 nanoparticelle internalizzate in una singola cellula. Un risultato analogo può essere osservato anche per le nanoparticelle di 200 nm. In queste ultime, però, il numero di nanoparticelle che vengono internalizzate dopo 3 h viene addirittura a triplicarsi passando da 73 nanoparticelle internalizzate dopo 1 h a 258 nanoparticelle internalizzate dopo 3 h da una singola cellula.

DISCUSSIONE

La problematica relativa alla quantificazione delle nanoparticelle è qualcosa di molto attuale e afferente a molti rami.

La quantificazione delle nanoparticelle viene resa però ancora più complicata dal dover interagire con le cellule. Queste, infatti, possedendo dei meccanismi di permeabilità selettiva, associati alle membrane che le rivestono, rendono ancora più difficile riuscire a determinare l'esatta proporzione fra il numero di nanoparticelle depositate e quello di nanoparticelle assorbite. Lo scopo di questo lavoro è stato di mettere a punto una tecnica che consentisse di quantificare il numero di nanoparticelle internalizzate da una singola cellula.

La necessità di effettuare una duplice analisi, sia qualitativa che quantitativa, è stata dettata dalla difficoltà di riuscire a quantizzare il numero di nanoparticelle che sono riuscite ad attraversare la membrana cellulare.

Per valutare le dimensioni e il numero degli aggregati che si sono formati all'interno delle cellule, è stata effettuata l'analisi delle immagini grazie al software Metamorph. I risultati ottenuti portano ad affermare che il valore dell'area media degli aggregati aumenta nel tempo sia per le nanoparticelle di 49 nm che per quelle di 200 nm. Ciò indica una dipendenza dal tempo del processo di internalizzazione di queste nanoparticelle. Al contrario, per quanto riguarda il numero degli aggregati, questo aumenta nel tempo solo per le nanoparticelle di 49 nm, mentre, per quelle di 200 nm, questo rimane pressoché costante. Questo risultato si può spiegare considerando le più piccole dimensioni delle nanoparticelle di 49 nm, che occupano un minore volume all'interno della cellula, al contrario di quelle di 200 nm, che, quindi, hanno una maggiore probabilità di incontrare gli aggregati preesistenti nella cellula e associarsi ad essi.

L'analisi qualitativa, realizzata con il software Metamorph, non ha consentito di ricavare il numero di nanoparticelle internalizzate. Ciò ha portato alla necessità di passare ad un'analisi quantitativa. Il numero di nanoparticelle contenuto nei campioni analizzati è stato ottenuto grazie all'uso di uno spettrofluorimetro. Tale metodo ha consentito il raggiungimento degli obiettivi iniziali. In pratica, si è potuto quantificare il numero di nanoparticelle internalizzate per tutti i campioni analizzati, che è risultato essere maggiore per le nanoparticelle di 49 nm. Ancora una volta è stato dimostrato come il processo di internalizzazione sia fortemente dipendente dalle dimensioni della particella.

Inoltre, dai valori ottenuti, si è osservato che l'internalizzazione di nanoparticelle è dipendente dal tempo, cioè, all'aumentare del tempo di esposizione dei campioni alle nanoparticelle,

aumenta il valore di nanoparticelle che riesce a superare la membrana cellulare e che si trova nelle cellule.

Ulteriori sviluppi di questo studio potrebbero riguardare una migliore comprensione del meccanismo con cui le nanoparticelle entrano (diffusione o endocitosi). La presenza di aggregati farebbe supporre ad un processo endocitico (formazione di vescicole endocitiche), anche se esperimenti preliminari hanno dimostrato che gli aggregati non colocalizzano con la clatrina, proteina deputata alla formazione di alcune delle vescicole endocitiche, e che il blocco dell'endocitosi a 4°C inibisce solo parzialmente l'internalizzazione (dati non mostrati). Inoltre, al fine di migliorare il monitoraggio del processo di internalizzazione, si potrebbe mettere a punto un sistema di rilevazione "live" utilizzando la tecnica FCS applicata al microscopio confocale. In tal modo si potrebbe seguire la nanoparticella durante l'attraversamento della membrana plasmatica.

-CAPITOLO 7-
CONCLUSIONI

Lo scopo di questo lavoro di tesi è stato chiarire i meccanismi che regolano l'interazione cellula-materiale e comprendere come la modulazione di alcune caratteristiche del materiale possa influenzare la risposta cellulare. A tal fine, sono stati utilizzati materiali di origine naturale, quali il collagene, la fibronectina e la laminina, e materiali sintetici, come il polietilenglicole e il polistirene, dei quali sono state modificate sia le proprietà chimico-fisiche che meccaniche. I materiali sintetici sono stati opportunamente bioattivati, mediante l'aggiunta di segnali biochimici specifici. Inoltre, sono state create delle superfici con gradi di rigidità variabili e materiali di dimensioni nanometriche, in modo da interagire con le macromolecole biologiche. Per osservare l'effetto di tali materiali sull'attivazione di varie funzioni cellulari, quali differenziamento, proliferazione, adesione, migrazione ed endocitosi, sono stati adoperati diversi tipi cellulari, cellule staminali embrionali, fibroblasti e cellule endoteliali.

In conclusione, i nostri dati suggeriscono che le proprietà del materiale influenzano il comportamento cellulare. In particolare, il materiale è capace di modulare il differenziamento di cellule ES cresciute in un ambiente 3D. Grazie all'interazione tra le cellule e la matrice circostante, le proprietà strutturali della matrice giocano un ruolo importante nel controllare lo sviluppo delle cellule ES, favorendo la crescita di corpi embrioidi e promuovendo il differenziamento tessuto specifico. Inoltre, i processi di adesione, proliferazione e migrazione di fibroblasti di topo NIH3T3 possono essere influenzati dall'esposizione, la densità e la distribuzione dei segnali di adesione, nonché dalle proprietà meccaniche (rigidità) del materiale. Infine, la dimensione del materiale può influire sul processo di internalizzazione mediato dalle cellule endoteliali: materiali di dimensioni maggiori, infatti, sfavoriscono il trasporto transmembrana.

Da questi risultati si evince che i processi cellulari dipendono fortemente dalle caratteristiche del materiale. Tuttavia, essendo questi processi piuttosto complessi, richiedono, spesso, una combinazione di due o più fattori, determinando, quindi, una maggiore difficoltà nella comprensione dei meccanismi alla base dell'interazione cellula-materiale. Ciononostante, i risultati di questo studio di tesi dovrebbero fornire informazioni utili per la progettazione di materiali innovativi per il controllo e la guida del funzionamento cellulare. Ad esempio, nuove matrici polimeriche dovrebbero incorporare queste informazioni per fornire un adeguato "milieu" per lo sviluppo di strutture tridimensionali simili a tessuti. O ancora, materiali sintetici possono essere progettati mediante l'incorporazione di peptidi specifici capaci di dirigere il differenziamento cellulare o creando delle superfici selettive solo per un determinato tipo cellulare.

BIBLIOGRAFIA

- Allen Mark, Jeff W. M. Bulte, Lars Liepold, Gautam Basu, Holly A. Zywicke, Joseph A. Frank, Mark Young, and Trevor Douglas, 2005, paramagnetic viral nanoparticles as potential high-relaxivity magnetic resonance contrast agents. *Magnetic resonance in medicine* 54: 807-812.
- Auger FA, Berthod F, Moulin V, Pouliot R, Germain L. Tissue-engineered skin substitutes: from in vitro constructs to in vivo applications. *Biotechnol Appl Biochem*. 2004 Jun;39(Pt 3):263-75.
- Arruda E.M. and Boyce M.C. A three-dimensional constitutive model for the large stretch behaviour of rubber elastic materials. *J. Mech. Phys. Solids* 41: 389-412. 1993
- Bain G, Kitchens D, Yao M, Huettner J, Gottlieb D. Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. *Dev Biol* 1995;168: 342-57.
- Balaban N.Q., Schwarz U. S., Rivelino D., Goichberg P., Tzur G., Sabanay I., Mahalu D., Safran S., Bershadsky A., Addadi L., Geiger B. Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using micropatterned substrates. 2001. *Nature Cell Biol*. 3: 466-472.
- Balconi G, Spagnuolo R, Dejana E. Development of endothelial cell lines from embryonic stem cells: a tool for studying genetically manipulated endothelial cells in vitro. *Arterioscler ThrombVasc Biol* 2000;20:1443-51.
- Ballestrem C, Hinz B, Imhof BA, Wehrle-Haller B Marching at the front and dragging behind: differential α V β 3-integrin turnover regulates focal adhesion behavior. *J Cell Biol* 2001 ; 155:139-1332
- Battista S, Pentimalli F, Baldassarre G, Fedele M, Fidanza V, Croce CM, Fusco A. Loss of Hmgal gene function affects embryonic stem cell lympho-hematopoietic differentiation. *FASEB J* 2003;17:1496-8.
- Battista S., D. Guarnieri, C. Borselli, S. Zepetelli, A. Borzacchiello, L. Mayol, D. Gerbasio, D.R. Keene, L. Ambrosio, P.A. Netti, The effect of matrix composition of 3D constructs on embryonic stem cell differentiation. *Biomaterials* 26 (2005) 31:6194.
- Beck K., I.T. Hunter, and J. Engel, Structure and function of laminin: anatomy of a multidomain glycoprotein. Review. *The FASEB journal* 4 (1990) 148.
- Beningo KA, Dembo M, Wang YL. Responses of fibroblasts to anchorage of dorsal extracellular matrix receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Dec 28;101(52):18024-9.
- Benoit M, Gabriel D, Gerish G, Gaub HE. Discrete interactions in cell adhesion measured by single-molecule force spectroscopy. *Nat Cell Biol*. 2000 Jun;2(6):313-7.
- Berk D.A., F. Yuan, M. Leunig, R.K. Jain, Fluorescence photobleaching with spatial Fourier analysis: measurement of diffusion in light-scattering media. *Biophys. J*. 65 (1993) 2428.
- Bershadsky A and Geiger B. Cytoskeleton associated anchor and signal transduction proteins. In *Guidebook to the extracellular matrix, Anchor and Adhesion proteins* (eds Kreis, T. and Vale R.) 3-11 (Oxford University Press, 1999).
- Besson E, Gue AM, Sudor J, Korri-Youssoufi H, Jaffrezic N, Tardy J. A novel and simplified procedure for patterning hydrophobic and hydrophilic SAMs for microfluidic devices by using UV photolithography. *Langmuir*. 2006 Sep 26;22(20):8346-52.

- Birk D. E., E. I. Zycband, S. Woodruff, D. A. Winkelmann, R. L. Trelstad, Collagen fibrillogenesis in situ: fibril segments become long fibrils as the developing tendon matures. *Dev. Dyn.* 208 (1997) 291.
- Birk D.E. and E. Zyckband, Assembly of the tendon extracellular matrix during development. *J. Anat.* 184 (1994) 457.
- Birk D.E. and E. Zyckband. Assembly of the collagenous extracellular matrix during tendon development in the chicken limb. *Prog. Clin. Biol. Res.* 383B (1993) 523.
- Birk D.E., M.V. Nurminkaya and E.I. Zycband. Collagen fibrillogenesis in situ: fibril segments undergo post-depositional modifications resulting in linear and lateral growth during matrix development. *Dev. Dyn.* 202 (1995) 229.
- Birk D.E., Type V collagen: heterotypic type I/V collagen interactions in the regulation of fibril assembly. *Micron* 32 (2001) 223.
- Bischoff J. Approaches to studying cell adhesion molecules in angiogenesis. *Trends Cell Biol* 1995;5:69–74.
- Bono P, Rubin K, Higgins JM and Hynes RO. Layilin, a novel integral membrane protein, is a hyaluronan receptor. *Mol Biol Cell.* 2001 Apr;12(4):891-900.
- Borzacchiello A., P.A. Netti and L. Ambrosio, in: *New Frontiers in Medical Sciences: Redefining Hyaluronan*, edited by G. Abatangelo and P. H. Weigel (Elsevier Science, Amsterdam, 2000) p. 195.
- Boyce ST, Warden GD. Principles and practices for treatment of cutaneous wounds with cultured skin substitutes. *Am J Surg.* 2002 Apr;183(4):445-56.
- Bretscher A, Drees B, Harsay E, Schott D, Wang T. What are the basic functions of microfilaments? Insights from studies in budding yeast. *J Cell Biol.* 1994 Aug;126(4):821-5.
- Brunette D.M., G.S. Kenner, T.R.L. Gould, Grooved titanium surfaces orient growth and migration of cells from human gingival explants, *J. Dent. Res.* 62 (1983) 1045-8.
- Burdick JA, Khademhosseini A, Langer R. Fabrication of gradient hydrogels using microfluidics/ photopolymerization process. *Langmuir.* 2004 Jun 22;20(13):5153-6.
- Burridge and Chrzanowska-Wodnicka. Focal adhesions, contractility, and signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1996;12:463-518. Review.
- Burridge K, Nuckolls G, Otey C, Pavalko F, Simon K, Turner C. Actin-membrane interaction in focal adhesions. *Cell Differ Dev.* 1990 Dec 2;32(3):337-42.
- Buzzoni G and Hemler ME. Are changes in integrin affinity and conformation overemphasized? *Trends Biochem Sci.* 1998 Jan;23(1):30-4. Review.
- Catherine C Berry, Adam S G Curtis, 2003, functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine *Journal of physics*, 36, 198-206.
- Chakravarti S., T. Magnuson, J.H. Lass, K.J. Jepsen, C. Lamantia, H. J. Carroll. Lumican regulates collagen fibril assembly: skin fragility and corneal opacity in the absence of lumican. *J. Cell Biol.* 141 (1998) 1277.

- Charnick SB, Lauffenburger DA.; Related Articles, Mathematical analysis of cell-target encounter rates in three dimensions. Effect of chemotaxis. *Biophys J.* 1990 May;57(5):1009-23.
- Choquet D., Felsenfeld D.P. and Sheetz M.P. Extracellular matrix rigidity causes strengthening of integrin-cytoskeleton linkages. *Cell* 88, 39-48 (1997).
- Cooper A., H.R. Munden, G.L. Brown, The growth of mouse neuroblastoma cells in controlled orientations on thin films of silicon monoxide, *Exp. Cell. Res.* 103 (1976) 435-9.
- Coucouvani E, Martin GR. Signals for death and survival: a two-step mechanism for cavitation in the vertebrate embryo. *Cell* 1995;83:279–87.
- Cukierman E, Pankov R, Stevens DR, Yamada KM. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science* 2001; 294:1708-1712
- Curtis A.S.G., B. Casey, J.O. Gallagher, D. Pasqui, M.A. Wood, C.D.W. Wilkinson, Substratum nanopography and the adhesion of biological cells. Are symmetry or regularity of nanopography important?, *Biophysical Chemistry* 94 (2001) 275-283.
- Dang H.S., V. R. Pullat, R. C. Sharma, 1995, Distribution of uranium in human organs of an urban indian population and its relationship with clearance half lives, *Health Phys*, 68, pp. 328-331.
- Dani C. Embryonic stem cell-derived adipogenesis. *Cells Tissues Organs* 1999;165:173–80.
- Danielson K.G., H. Baribault, D.F. Holmes, H. Graham, K.E. Kadler, R.V. Iozzo, Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility. *J. Cell Biol.* 136 (1997) 729.
- DeLong SA, Gobin AS., West JL, 2005, Covalent immobilization of RGDS on hydrogel surfaces to direct cell alignment and migration. *Journal of Controlled Release* 109 (2005) 139 148.
- DeMali KA, Barlow CA, Burridge K. Recruitment of the Arp2/3 complex to vinculin: coupling membrane protrusion to matrix adhesion. *J Cell Biol.* 2002; 159: 881-891
- Di Lullo G. A., S. M. Sweeney, J. Ko"Rkko", L. Ala-Kokko, J. D. San Antonio, J. Mapping the ligand-binding sites and disease-associated mutations on the most abundant protein in the human, type I collagen. *Biol. Chem.* 277 (2002) 4223.
- DiMilla PA, Albelda SM, Lauffenburger DA, Quinn JA. Measurement of Cell Adhesion and Migration on Protein-Coated Surfaces. *Mat. Res. Soc. Symp. Proc.* 252: 205-212 (1992).
- DiMilla PA, Barbee K, Lauffenburger DA. Mathematical model for the effects of adhesion and mechanics on cell migration speed. *Biophys J.* 1991 Jul;60(1):15-37.
- DiMilla PA, Stone JA, Quinn JA, Albelda SM, Lauffenburger DA. Maximal migration of human smooth muscle cells on fibronectin and type IV collagen occurs at an intermediate attachment strength. *J Cell Biol.* 1993 Aug;122(3):729-37.
- Discher DE, Janmey P, Wang YL. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science.* 2005 Nov 18;310(5751):1139-43.
- Djabourov M, Lechaire JP, Gaill F. Structure and rheology of gelatin and collagen gels. *Biorheology* 1993;30:191–205.

- Dublet B. and M. Van Der Rest, Type XIV collagen, a new homotrimeric molecule extracted from fetal bovine skin and tendon, with a triple helical disulfide-bonded domain homologous to type IX and type XII collagens. *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 17 724.
- Dublet B. and M. Van Der Rest. Type XII collagen is expressed in embryonic chick tendons. Isolation of pepsin-derived fragments. *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 6853.
- Edidin M., Y. Zagyansku, T. Lardener, Measurement of membrane protein lateral diffusion in single cells. *Science* 191 (1976) 466.
- Engel J. and H. Furthmayr. Electron microscopy and other physical methods for the characterization of extracellular matrix components: laminin, fibronectin, collagen IV, collagen VI, and proteoglycans. *Methods Enzymol.* 145 (1987) 3.
- Epple M, Rueger JM. *FestKorperchemie und Chirurgie. Nachr Chem Tech Lab* 1999;47:1405-10
- Feghva Meng, Gerard H. M. Engbers, Jan Feijen, polyethylene glycol-grafted polystyrene particles, Wiley periodicals interScience, 2004, 49-58.
- Ferry JD. *Viscoelastic properties of polymers.* New York, NY: Wiley; 1970. p. 33–55.
- Fittkau MH, Zilla P, Bezuidenhout D, Lutolf MP, Human P, Hubbell JA, Davies N. The selective modulation of endothelial cell mobility on RGD peptide containing surfaces by YIGSR peptides. *Biomaterials.* 2005 Jan;26(2):167-74.
- Flemming R.G., C.J. Murphy, G.A. Abrams, S.L. Goodman, P.F. Nealey, Effects of synthetic micro- and nano-structured surfaces on cell behavior, *Biomaterials* 20 (1999) 573-588.
- Francis SE, Goh KL, Hodivala-Dilke K, Bader BL, Stark M, Davidson D, Hynes R. Central roles of $\alpha 5 \beta 1$ integrin and fibronectin in vascular development in mouse embryos and embryoid bodies. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:927–33.
- Friedl P, Brocker EB. The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci.* 2000 Jan 20;57(1):41-64.
- Friedl P, Wolf K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer.* 2003 May;3(5):362-74.
- Fujimoto K., T. Takahashi, M. Miyaki, H. Kawaguchi, Cell activation by the micropatterned surface with settling particles, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 8 (1997) 879-91.
- Giancotti FG and Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science.* 1999 Aug 13;285(5430):1028-32. Review.
- Glukhova MA, Thiery JP. Fibronectin and integrins in development. *Semin Cancer Biol* 1993;4:241–9.
- Gobin AS, West JL. Cell migration through defined, synthetic ECM analogs. *FASEB J.* 2002 May;16(7):751-3. Epub 2002 Mar 26.
- Gref R, Luck M, Quellec P, Marchand M, Dellacherie E, Harnisch S, Blunk T, Muller RH. 'Stealth' corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2000 Oct 1;18(3-4):301-313.

- Harley N.H., E.C.Foulkes, L.H.Hilborne, A.Hudson and C.R. Anthony, Depleted Uranium. A Review of the Scientific Literature as it Pertains to Gulf War Illness, National Defense Research Institute RAND, Volume 7, 1999.
- Health Physics Society, Bioassay Programs for Uranium: An American National Standard, HPS N13.22-1995, McLean, Va., October 1995.
- Helfman DM et al. Caldesmon inhibits nonmuscle cell contractility and interferes with the formation of focal adhesions. *Mol Cell. Biol.* 10, 3097-3112 (1999).
- Helmlinger G, Netti PA, Lichtenbeld HC, Melder RJ, Jain RK. Solid stress inhibits the growth of multicellular tumor spheroids. *Nat Biotechnol* 1997;15:778–83.
- Hern DL, Hubbell JA. Incorporation of adhesion peptides into nonadhesive hydrogels useful for tissue resurfacing. *J Biomed Mater Res.* 1998 Feb;39(2):266-76.
- Hersel U, Dahmen C, Kessler H. RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials.* 2003 24:4385-4415. Review.
- Hirashima M, Kataoka H, Nishikawa S, Matsuyoshi N, Nishikawa S-I. Maturation of embryonic stem cells into endothelial cells in an in vitro model of vasculogenesis. *Blood* 1999;93:1253–63.
- Hoet Peter HM, Irene Brüske-Hohlfeld, Oleg V. Salata 2004 nanoparticles-known and unknown health risks *Journal of nanobiotechnology*, 2, 1477-3155.
- Hofmann H., A. Petri, M. Chastellain, M. Hofmann, 2001, superparamagnetic nano-particle preparation for medical application, *European Cells and Materials*, vol. 2,suppl. 1, page 29-30.
- Holly SP, Larson MK, Parise LV. Multiple roles of integrins in cell motility. *Exp Cell Res* 2000;261:69–74.
- Holzappel G.A. *Nonlinear solid mechanics: A continuum approach for engineering.* John Wiley and Sons. 2000 cap.7.
- Howe AK, Baldor LC, Hogan BP. Spatial regulation of the cAMP-dependent protein kinase during chemotactic cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Oct 4;102(40):14320-5. Hubbell JA. Biomaterials in tissue engineering. *Biotechnology (N Y).* 1995 Jun;13(6):565-76.
- Hubbell J. Bioactive biomaterials. *Curr Opin Biotechnol* 1999; 10:123-9
- Hubbell J. Biomaterials in tissue engineering. *Biotechnology (N Y)* 1995; 13:565-76
- Hubbell JA. Materials as morphogenetic guides in tissue engineering. *Curr Opin Biotechnol* 2003;14:551–8.
- Humphries MJ and Newham P. The structure of cell-adhesion molecules. *Trends Cell Biol.* 1998 Feb;8(2):78-83. Review.
- Humphries MJ. The molecular basis and specificity of integrin-ligand interactions. *J Cell Sci.* 1990 Dec;97 (Pt 4):585-92.
- Hynes R O. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992; 69:11-25
- Hynes R. O., *Fibronectins* 1st Ed. (Springer-Verlag, New York, 1990) p.546.

- Hynes RO. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell*. 1987 Feb 27;48(4):549-54.
- Ingber D. Integrins as mechanochemical transducers. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 3, 841-848 (1991).
- Ingber DE. 2006. Mechanical control of tissue morphogenesis during embryological development. *Int. J. Dev. Biol.* 50: 255-266.
- Jain R.K., R.J. Stock, S.R. Chary, M. Reuter, Convection and diffusion measurements using fluorescence recovery after photobleaching and video image analysis: in vitro calibration and assessment. *Microvasc. Res.* 39 (1990) 77.
- Jeon NL, Baskaran H, Dertinger SKV, Whitesides GM, Van De Water L, Toner M. Neutrophil chemotaxis in linear and complex gradients of interleukin-8 formed in a microfabricated device. *Nature Biotechnology* 20, 826-830;01 Aug 2002.
- Jiang B, Liou GI, Behzadian MA, Caldwell RB. Astrocyte modulate retinal vasculogenesis: effects of fibronectin expression. *J Cell Sci* 1994;107:2499–508.
- Kadler K. E., D. F. Holmes, J. A. Trotter, J. A. Chapman, Collagen fibril formation. *Biochem. J.* 316 (1996) 1.
- Kadler K.E., Y. Hojima, and D.J. PROCKOP, Collagen fibrils in vitro grow from pointed tips in the C- to N-terminal direction. *Biochem. J.* 268 (1990) 339.
- Kaehler J, Zilla P, Fasol R, Deutsch M, Kadletz M. Precoating substrate and surface configuration determine adherence and spreading of seeded endothelial cells on polytetrafluoroethylene grafts. *J Vasc Surg.* 1989 Apr;9(4):535-41.
- Keene D.R., G.P. Lunstrum, N.P. Morris, D.W. Stoddard, R.E. Burgeson, Two type XII-like collagens localize to the surface of banded collagen fibrils. *J. Cell Biol.* 113 (1991) 971.
- Keller GM. In vitro differentiation of embryonic stem cells. *Curr Opin Cell Biol* 1995;7:862–9.
- Keselowsky BG and Garcia AJ. Quantitative methods for analysis of integrin binding and focal adhesion formation on biomaterial surfaces. *Biomaterials.* 2005 Feb;26(4):413-8.
- Keselowsky BG, Collard DM, Garcia AJ. Surface chemistry modulates focal adhesion composition and signaling through changes in integrin binding. *Biomaterials.* 2004 Dec;25(28):5947-54.
- Kuang W, Xu H, Vachon PH, Engvall E. Disruption of the lama2 gene in embryonic stem cells: laminin alpha 2 is necessary for sustenance of mature muscle cells. *Exp Cell Res* 1998;241: 117–25.
- Kuntz R.M. and W.M. Saltzman, Neutrophil motility in extracellular matrix gels: mesh size and adhesion affect speed of migration. *Biophys. J.* 72 (1997)1472.
- Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science.* 1993 May 14;260(5110):920-926.
- Lauffenburger DA, Horwitz AF. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell.* 1996 Feb 9;84(3):359-69.
- Lauffenburger DA, Linderman JJ. Receptors: Models for Binding, Trafficking and Signaling,

- Lauffenburger DA. Models for receptor-mediated cell phenomena: adhesion and migration. *Annu Rev Biophys Chem.* 1991;20:387-414.
- Laukaitis CM, Webb DJ, Donais K, Horwitz AF. Differential dynamics of alpha 5 integrin, paxillin, and alpha-actinin during formation and disassembly of adhesions in migrating cells. *J Cell Biol.* 2001;153:1427-1440
- Levenberg S, Huang NF, Lavik E, Rogers AB, Itskovitz-Eldor J, Langer R. Differentiation of human embryonic stem cells on three-dimensional polymer scaffolds. *Proc Natl Acad Sci* 2003; 100:12741-6.
- Levenberg S, Langer R. Advances in tissue engineering. *Curr Top Dev Biol.* 2004;61:113-34.
- Li JM, Menconi MJ, Wheeler HB, Rohrer MJ, Klassen VA, Ansell JE, Appel MC. Precoating expanded polytetrafluoroethylene grafts alters production of endothelial cell-derived thrombomodulators. *J Vasc Surg.* 1992 Jun;15(6):1010-7.
- Liu WF, Chen CS. Engineering biomaterials to control cell function. *Materials today.* Dec 2005; vol. 8, number 12:28-35.
- Lo CM, Wang HB, Dembo M, Wang YL. Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophys J.* 2000 Jul;79(1):144-52.
- Löbenberg Raimar, 2003, smart materials: applications of nanotechnology in drug delivery and drug targeting proceedings of the international conference on MEMS, NANO and smart systems.
- Maheshwari G, Brown G, Lauffenburger DA, Wells A, Griffith L. Cell adhesion and motility depend on nanoscale RGD clustering. *J Cell Sci.* 2000 May;113 (Pt 10):1677-86.
- Maheshwari G, Lauffenburger DA. Deconstructing (and reconstructing) cell migration. *Microsc Res Tech.* 1998 Dec 1;43(5):358-68.
- Maheshwari G, Wells A, Griffith LG, Lauffenburger DA. Biophysical integration of effects of epidermal growth factor and fibronectin on fibroblast migration. *Biophys J.* 1999 May;76(5):2814-23.
- Makowski L., B. Magdoff-Fairchild, Polymorphism of sickle cell hemoglobin aggregates: structural basis for limited radial growth. *Science* 234 (1986) 1228.
- Mann BK, West JL. Cell adhesion peptides alter smooth muscle cell adhesion, proliferation, migration, and matrix protein synthesis on modified surfaces and in polymer scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research* (2000).
- Martin G. R. and R. Timpl, Laminin and other basement membrane components. *Annu. Rev. Cell Biol.* 3 (1987) 57.
- Martin G. R., R. Timpl and K. Kuhn, Basement membrane proteins: molecular structure and function. *Adv. Protein Chem.* 39 (1988) 1.
- Massia SP, Hubbell JA. Covalent surface immobilization of Arg-Gly-Asp- and Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg-containing peptides to obtain well-defined cell-adhesive substrates. *Anal Biochem.* 1990 Jun; 187(2):292-301.

- Massia SP, Rao SS, Hubbell JA. Covalently immobilized laminin peptide Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg (YIGSR) supports cell spreading and co-localization of the 67-kilodalton laminin receptor with alfa-actinin and vinculin. *J Biol Chem.* 1993; 268(11):8053-8059.
- Mellott MB, Searcy K, Pishko MV. Release of protein from highly cross-linked hydrogels of poly(ethylene glycol) diacrylate fabricated by UV polymerization. *Biomaterials.* 2001 May; 22(9):929-41.
- Min Lo C., Wang HB, Dembo M and Wang YI, 2000. Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophysical Journal* 79: 144-152.
- Miner J. H. and P. D. Yurchenco, Laminin functions in tissue morphogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20 (2004) 255.
- Mosher D.F., Fibronectin. (Academic Press, San Diego, 1989) p. 474.
- Mrksich M, Chen CS, Xia Y, Dike LE, Ingber DE, Whitesides GM. Controlling cell attachment on contoured surfaces with self-assembled monolayers of alkanethiolates on gold. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Oct 1;93(20):10775-8.
- Mrksich M, Dike LE, Tien J, Ingber DE, Whitesides GM. Using microcontact printing to pattern the attachment of mammalian cells to self-assembled monolayers of alkanethiolates on transparent films of gold and silver. *Exp Cell Res.* 1997 Sep 15;235(2):305-13.
- Mrksich M. A surface chemistry approach to studying cell adhesion. *Chem Soc Rev.* 2000. 29:267-273.
- Nobes CD and Hall A. Rho, rac and cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion and motility. *Biochem Soc Trans.* 1995 23:456-459
- Oakley C., D.M. Brunette, The sequence of alignment of microtubules, focal contacts and actin filaments in fibroblasts spreading on smooth and grooved titanium substrata, *J. Cell. Sci.* 106 (1993) 343-54.
- Oakley C., N.A.F. Jaeger, D.M. Brunette, Sensitivity of fibroblasts and their cytoskeletons to substratum topographies: topographic guidance and topographic compensation by micromachined grooves of different dimensions, *Exp. Cell. Res.* 234, 413-424 (1997).
- Ohara P.T., R.C. Buck, Contact guidance in vitro: a light, transmission, and scanning electron microscopic study, *Exp. Cell. Res.* 121 (1979) 235-49.
- Pankhurst Q A t, J Connolly, S K Jones and J Dobson, 2003, Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine, *journal of physics*, volume 36, R167-R181.
- Panyam Jayanth, Wen-Zhong Zhou, Swayam Prabha, Sanjeeb K. Sahoo, and Vinod Labhasetwar 2002, rapid endo-lysosomal escape of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles: implication for drug and gene delivery, *the Faseb journal*, volume 16, pag.1217-1226.
- Paulsson M., Noncollagenous proteins of basement membranes. *Collagen Relat. Res.* 7 (1987) 443.
- Peters R., J. Peters, K.H. Tews, W. Bahr, A microfluorimetric study of translational diffusion in erythrocyte membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 367 (1974) 282.

- Pistoleri G. F., R. Caudana, G. Cittadini, G. Garlaschi, La risonanza magnetica; “Fiocco rosa” nella diagnostica mediante immagini. *Federazione medica- XXXVIII-8*. 1985-887.
- Plancon S, Morel-Klopp MC, Schaffner-Reckinger, Chen P, Kieffer N. Green fluorescent protein (GFP) tagged to the cytoplasmic tail of alphaIIb or beta3 allows the expression of a fully functional integrin alphaIIb(beta3): effect of beta3GFP on alphaIIb(beta3) ligand binding. *Biochem J*. 2001 Jul 15;357(Pt 2):529-36.
- Pozzi Mucelli R., 2004, considerazioni sui mezzi di contrasto per risonanza magnetica, *Radiol Med* 107 (suppl al N. 4); 32-33.
- Press W.H., S.A. Teukolky, W.T. Vetterling, B.P. Flannery, *Numerical Recipes in C*, 2nd ed. (Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1992).
- Prockop D.J. and D.J.S. Hulmes, in: *Extracellular Matrix Assembly and Structure*, edited by P.D. Yurchenco, D.E. Birk and R.P. Mecham (New York: Academic Press, 1994) p. 47.
- Raeber GP, Lutolf MP, Hubbell JA.. Molecularly engineered PEG hydrogels: a novel model system for proteolytically mediated cell migration. *Biophys J*. 2005 Aug;89(2):1374-88. Epub 2005 May 27.
- Raucher D, Sheetz MP. Cell spreading and lamellipodial extension rate is regulated by membrane tension. *J Cell Biol*. 2000 Jan 10;148(1):127-36.
- Richardson T, Peters M, Ennett A, Mooney D. Polymeric system for dual growth factor delivery. *Nat Biotechnol* 2001;19:1029-34
- Romanic A.M., E. Adachi, Y. Hojima, J. Engel And D.J. J. Prockop, Polymerization of pNcollagen I and copolymerization of pNcollagen I with collagen I. A kinetic, thermodynamic, and morphologic study. *Biol. Chem.* 267 (1992) 22265.
- Rottner K, Hall A, Small JV. Interplay between Rac and Rho in the control of the substrate contact dynamics. *CurrBiol* 1999;9:640-648
- Ruoslahti E. Integrins. *J Clin Invest* 1991;87:1-5.
- Ruoslahti E. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1996;12:697-715. Review.
- Sachinidis A, Fleischmann BK, Kolossov E, Wartenberg M, Sauer H, Heschler J. Cardiac specific differentiation of mouse embryonic stem cells. *Cardiovasc Res* 2003;58:278-91.
- Sagvolden G, Giaever I, Pettersen EO and Feder J. Cell adhesion force microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Jan 19;96(2):471-6.
- Schmidt JA, AF. von Recum, Texturing of polymer surfaces at the cellular level, *Biomaterials* 12 (1991) 385-9.
- Schoenwaelder SM and Burridge K. Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins. *Curr Opin Cell Biol*. 1999 Apr;11(2):274-86. Review.
- Schroeder Ulrike, Petra Sommerfeld, Sven Ulrich, Bernhard A. Sabel, 1998, nanoparticle technology for delivery of drugs across the blood-brain barrier, *journal of pharmaceutical sciences*, volume 87, 1305-1310.

- Schwartz M A, Schaller M D and Gisberg M H. Integrins: emerging paradigms of signal transduction. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 1995; 11:549-599
- Scotchford C.A., M. Ball, M. Winkelmann, J. Vörös, C. Csucs, D.M. Brunette, G. Danuser, M. Textor, Chemically patterned, metal-oxide-based surfaces produced by photolithographic techniques for studying protein- and cell-interactions II: Protein adsorption and early cell interactions, *Biomaterials* 24 (2003) 1147-1158.
- Seeger JM, Klingman N. Improved endothelial cell seeding with cultured cells and fibronectin-coated grafts. *J Surg Res.* 1985 Jun;38(6):641-7.
- Shaw L.M., B.R. Olsen, FACIT collagens: diverse molecular bridges in extracellular matrices. *Trends Biochem. Sci.* 16 (1991) 191.
- Shinkai Masashige, 2002, review: functional magnetic particles for medical application, *journal of bioscience and bioengineering*, vol.94, no. 6, 606-613.
- Soriano P, Montgomery C, Geske R, Bradley A. Targeted disruption of the c-src proto-oncogene leads to osteoporosis in mice. *Cell* 1991;64:693–702.
- Sottile J, Hocking DC, Swiatek PJ. Fibronectin matrix assembly enhances adhesion-dependent cell growth. *J Cell Sci* 1998;111: 2933–43.
- Stokes CL, Lauffenburger DA, Williams SK. Migration of individual microvessel endothelial cells: stochastic model and parameter measurement. *J Cell Sci.* 1991 Jun;99 (Pt 2):419-30
- Stupack DG, Cheresh DA. ECM remodeling regulates angiogenesis: endothelial integrins look for new ligands. *Sci STKE* 2002; 2002:PE7.
- Svensson L., A. Aszodi, F.P. Reinholt, R. Fassler, D. Heinegard, A. Oldberg, J. Fibromodulin-null mice have abnormal collagen fibrils, tissue organization, and altered lumican deposition in tendon. *Biol. Chem.* 274 (1999) 9636.
- Thull R. Surface functionalization of materials to initiate autocompatibilization in vivo. *Materialswiss Werkst* 2001;32:949-52
- Thull R. Surface functionalization of materials to initiate autocompatibilization in vivo. *Materialswiss Werkst.* 2001;32:949-52.
- Timpl R. And M. Dziadek, Structure, development, and molecular pathology of basement membranes. *Rev. Exp. Pathol.* 29 (1986) 1.
- Tsay T.T., K.A. Jacobson, Spatial Fourier analysis of video photobleaching measurements. Principles and optimization. *Biophys. J.* 60 (1991) 360.
- Turner CE, Burridge K. Transmembrane molecular assemblies in cell-extracellular matrix interactions. *Curr Opin Cell Biol.* 1991 Oct;3(5):849-53.
- Uzan G, Prandini MH, Rosa JP, Berthier R. Hematopoietic differentiation of embryonic stem cells: an in vitro model to study gene regulation during megakaryocytopoiesis. *Stem Cells* 1996; 14(Suppl. 1):194–9.
- Van der Fuler A, Sonnenberg A. Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res* 2001;305:285-98

- VandeVondele S, Voros J, Hubbell JA. RGD-grafted poly-L-lysine-graft-(polyethylene glycol) copolymers block non-specific protein adsorption while promoting cell adhesion. *Biotechnol Bioeng.* 2003 Jun 30;82(7):784-90.
- VandeVondele S, Voros J, Hubbell JA. RGD-grafted poly-L-lysine-graft-(polyethylene glycol) copolymers block non-specific protein adsorption while promoting cell adhesion. *Biotechnol Bioeng.* 2003 Jun 30;82(7):784-90.
- Walchli C., M. Koch, M. Chiquet, B.F. Odermatt, B. Trueb, Tissue-specific expression of the fibril-associated collagens XII and XIV. *J. Cell Sci.* 107 (1994) 669.
- Ware MF, Wells A, Lauffenburger DA. Epidermal growth factor alters fibroblast migration speed and directional persistence reciprocally and in a matrix-dependent manner. *J Cell Sci.* 1998 Aug;111 (Pt 16):2423-32.
- Weisel J.W., C. Nagaswami, L. Makowski, Twisting of fibrin fibers limits their radial growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987) 8991.
- Weiss P., Cell contact, *Int. Rev. Cytol.* 7 (1958) 391-423.
- Wilkinson P.C., J.M. Shields, W.S. Haston, Contact guidance of human neutrophil leukocytes, *Exp. Cell. Res.* 140 (1982) 55-62.
- Winkelmann M., J. Gold, R. Hauert, B. Kasemo, N.D. Spencer, D.M. Brunette, M. Textor, Chemically patterned, metal oxide based surfaces produced by photolithographic techniques for studying protein- and cell-surface interactions I: Microfabrication and surface characterization, *Biomaterials* 24 (2003)1133-1145.
- Yamada KM, Geiger B. Molecular interactions in cell adhesion complexes. *Curr Opin Cell Biol.* 1997 Feb;9(1):76-85.
- Yamada KM, Pankov R, Cukierman. Dimensions and dynamics in integrin function. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 2003; 36:959-966
- Yanitzky T, Volk T. Laminin is required for heart, somatic muscles, and gut development in the *Drosophila* embryo. *Dev Biol* 1995;169:609-18.
- Young B.B., M.K. Gordon, D.E. Birk. Expression of type XIV collagen in developing chicken tendons: association with assembly and growth of collagen fibrils. *Dev. Dyn.* 217 (2000) 430.
- Zaari N, Rajagopalan P, Kim SK, Engler AJ, Wong JY. Photopolymerization in Microfluidic Gradient Generators: Microscale Control of Substrate Compliance to Manipulate Cell Response *Advanced Materials* Vol. 16, Issue 23-24, December 2004, 2133-2137
- Zamir E and Geiger B. Components of cell-matrix adhesions. *J.Cell.Science* 2001; 114:3577-3579
- Zamir E and Geiger B. Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J.Cell.Science* 2001; 114:3583-3590
- Zamir E, Katz M, Posen Y, Erez N, Yamada KM, Katz BZ, Lin S, Lin DC, Bershdsky A, Kam Z, et al. Dynamics and segregation of cell-matrix adhesions in cultured fibroblasts. *Nat Cell Biol.* 2:191-196

Zhu B, Eurell T, Gunawan R, Leckband D. Chain-length dependence of the protein and cell resistance of oligo(ethylene glycol)-terminated self-assembled monolayers on gold. *J Biomed Mater Res.* 2001 Sep 5;56(3):406-16.

Zimmerman E, Geiger B and Addadi L. Initial stages of cell-matrix adhesion can be mediated and modulated by cell-surface hyaluronan. *Biophys J.* 2002 Apr;82(4):1848-57.

Ed eccoci all'ultima pagina, la più importante.

Non credevo di riuscirci e, invece, sono qui e questo lo devo a tutte le persone che in questi tre anni mi hanno sostenuto e aiutato.

Ringrazio il prof. Netti che mi ha introdotto e fatto conoscere l'affascinante mondo dell'Ingegneria e che mi ha fornito utili consigli e importanti spunti di riflessione per condurre le mie ricerche.

Grazie alla mia famiglia, senza la quale non sarei qui. Grazie perché mi ha seguita in tutta la mia vita, mi ha fatto crescere, sostenuto e trasmesso insegnamenti importanti di cui farò tesoro.

Un grazie particolare a mia sorella Francesca che ha sopportato i miei isterismi di questi tre anni e non solo (Non deve essere stato facile, lo ammetto).

Grazie Angelo, e non ho bisogno di aggiungere altro...

E poi, come non ringraziare tutto il gruppo BIO. Carmen, Stefania e Olimpia., in voi ho trovato non solo delle bravissime colleghe, ma soprattutto delle amiche sincere. Insieme siamo riuscite a portare un po' di ordine in questo "disordinato" mondo di ingegneri. Mi siete state sempre vicine, anche in quei momenti in cui non era tanto facile parlare con me. Ringrazio Michela e Maria che mi hanno fatto sentire una biotecnologa meno sola.

Grazie a Sabrina, Susi e Cristina: mi avete dato un valido aiuto ad accrescere il mio spirito critico nella discussione dei risultati.

Un grazie infinite a Paolo. Sei unico! Scusami se sono stata qualche volta (o spesso?) troppo assillante, ma se tu non ci fossi stato, non so come avrei fatto.

Grazie ad Angela, sei la ragazza più cara e sensibile che io conosca. Mi hai fatto vedere sempre il lato buono delle cose e mi hai trasmesso l'amore e l'entusiasmo che metti in quello che fai.

Grazie ancora a Silvia, Sabatino, Ilaria, Ciccio, Laura, Giorgia, Alessia, Valentina, Enrica, per avermi fatto sentire come a casa.

Grazie a tutto il gruppo di Proprietà meccaniche, Vincenzo, Antonio, Luigi, Biagio, Valeria e Mariagrazia: su di voi si può sempre contare.

Grazie a Don Gennaro per il suo buon umore che mi accompagna ogni mattina.

Grazie al sig. Maggio, il mio "nonno" acquisito, e a Stefano per avermi sempre accolto con grande disponibilità in officina.

Grazie ad Antonio, Maurizio e Brigida. E' stato un onore avervi come miei colleghi di dottorato.

Ringrazio i miei amici, TUTTI gli amici più cari, quelli vicini e quelli lontani, per non avermi lasciato sola, chi in un modo e chi nell'altro, ad affrontare questi anni.