



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

Facoltà di Ingegneria

**Dipartimento di Scienze e Ingegneria dei Materiali, dell'Ambiente ed
Urbanistica (SIMAU)**

Corso di laurea in Ingegneria Biomedica

**Caratterizzazione mediante microscopia elettronica a scansione di scaffold
contenenti cellule realizzati mediante stampa 3D**

**(Characterization by scanning electron microscopy of scaffolds containing
cells made by 3D printing)**

Relatrice:

Prof.ssa Alida Mazzoli

Correlatrici:

Prof.ssa Francesca Luzi

Prof.ssa Pasquapina Ciarmela

Laureanda:

Martina Stevanato

Anno accademico 2022/2023



Indice

| | |
|--|----|
| Introduzione | 4 |
| 1. Ingegneria tessutale | 5 |
| 1.2 Scaffold | 8 |
| 1.3 Geometria dello scaffold | 9 |
| 1.4 Vincoli meccanici dello scaffold | 10 |
| 1.5 Struttura di scaffold 3D | 11 |
| 1.6 Materiali utilizzati | 12 |
| 2. Tecniche di bioprinting | 15 |
| 2.2 Modellazione e processo di stampa | 17 |
| 3. Cellule | 19 |
| 3.2 Anatomia e fisiologia delle cellule | 21 |
| 3.3 Studio morfologico | 24 |
| 3.4 Cellule tumorali | 25 |
| 3.5 Morte cellulare programmata (apoptosi) | 26 |
| 3.6 Estratto di fragole | 27 |
| 4. Microscopia elettronica | 28 |
| 4.2 Le origini | 32 |
| 4.3 Preservazione dei campioni e allestimento dei preparati | 33 |
| 4.4 Come rendere visibili le cellule | 35 |
| 4.5 Struttura e funzionamento | 36 |
| 4.6 Modalità di funzionamento | 38 |
| 4.7 Immagini | 41 |
| 5. Risultati | 43 |
| Bibliografia | 51 |
| Ringraziamenti | 52 |

Introduzione

La caratterizzazione mediante microscopia elettronica a scansione (SEM) di scaffold contenenti cellule realizzati mediante stampa 3D può fornire informazioni dettagliate sulla morfologia e la struttura degli scaffold, nonché sulla distribuzione delle cellule all'interno di essi. La stampante 3D, oggi, è diventata una tecnologia molto utilizzata per la fabbricazione di scaffold, strutture tridimensionali che forniscono supporto strutturale e promuovono la crescita e la differenziazione delle cellule al loro interno.

Il SEM è una tecnica di imaging ad alta risoluzione che utilizza un fascio di elettroni per esaminare la superficie di un campione.

Per effettuare la caratterizzazione mediante SEM di scaffold, è necessario seguire una serie di passaggi, come la preparazione del campione attraverso la fissazione delle cellule nel scaffold utilizzando un fissativo e successivamente seccato utilizzando metodi appropriati; il rivestimento conduttivo poiché il SEM richiede un campione conduttivo per evitare la carica elettrostatica, di conseguenza si effettuano rivestimenti di oro o platino.

Durante l'analisi al SEM, è possibile ottenere informazioni sulla morfologia del scaffold, come la rugosità superficiale, la porosità e la distribuzione delle fasi o dei materiali utilizzati per la stampa 3D. Inoltre, il SEM può rivelare la posizione, l'adesione e la distribuzione delle cellule all'interno del scaffold. Le cellule possono apparire come strutture sferiche o allungate, e la loro interazione con il materiale del scaffold può essere osservata.

Dato che l'analisi al SEM richiede la preparazione del campione, essa può influire sulla sua struttura e sulla distribuzione delle cellule. Pertanto, è necessario prestare attenzione durante la preparazione del campione per mantenere le caratteristiche del scaffold e delle cellule il più intatte possibile.

1. Ingegneria tessutale

Negli ultimi tre decenni è emersa un'attività chiamata ingegneria tessutale e medicina rigenerativa, in cui scienziati, ingegneri e medici applicano strumenti provenienti da diversi campi per costruire sostituti biologici in grado di imitare i tessuti per scopi diagnostici e di ricerca e di sostituire (o aiutare a rigenerare) tessuti malati e danneggiati.

Una parte significativa di questi sforzi si è tradotta in terapie efficaci, soprattutto nelle aree della sostituzione della pelle e, in misura minore, della riparazione della cartilagine.

Una buona parte del lavoro svolto ha prodotto anche prototipi di altri tessuti sostitutivi, come condotti nervosi, vasi sanguigni, fegato e persino cuore. Un'altra conseguenza è stata l'introduzione di alcune nuove tecnologie (ad esempio la stampa 3D) che potrebbe consentire futuri progressi. [1]

Il successo nella creazione di un tessuto funzionale ingegnerizzato si basa sulla combinazione di cellule, biomateriali e fattori di crescita. Altro componente essenziale è il bioreattore che deve fornire perfusione e stimoli fisici per migliorare la vitalità cellulare e la funzione tissutale.

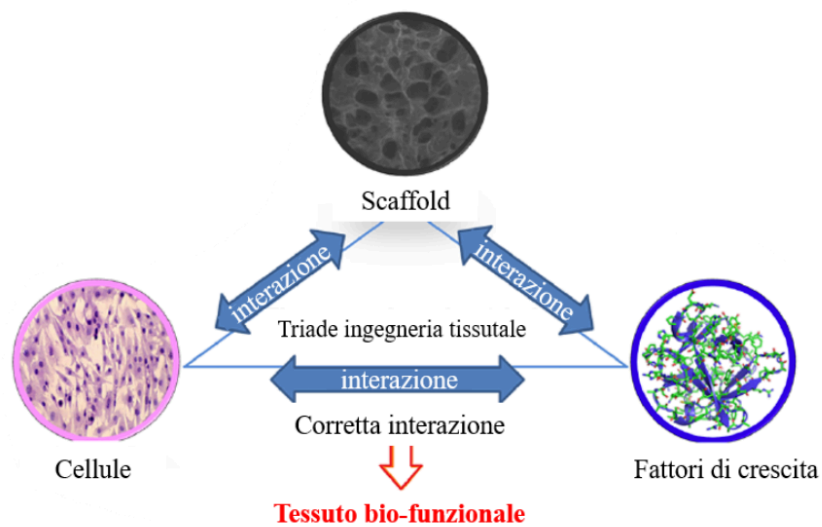


Fig. 1 rappresentazione schematizzata della creazione di un tessuto funzionale ingegnerizzato

Nell'ingegneria tissutale uno scaffold è un supporto o una matrice realizzato per facilitare la migrazione, l'adesione o il trasporto di cellule e agenti bioattivi.

Il tradizionale sistema di coltura cellulare bidimensionale (2D) in vitro (su un supporto piatto) è stato a lungo utilizzato nella ricerca sul cancro. Tuttavia, questo sistema non può essere completamente tradotto in studi clinici per rappresentare idealmente le condizioni fisiologiche. Questa coltura non può imitare il microambiente tumorale naturale a causa della mancanza di comunicazione cellulare (cellula-cellula) e di interazione (cellula-cellula e cellula-matrice). Per superare queste limitazioni, i sistemi di coltura tridimensionali (3D) sono sempre più sviluppati nella ricerca e sono diventati essenziali per la ricerca sui tumori, l'ingegneria dei tessuti e la ricerca sulla biologia di base. La coltura 3D ha ricevuto molta attenzione nel campo della biomedicina grazie alla sua capacità di imitare la struttura e la funzione dei tessuti. La matrice 3D presenta un quadro altamente dinamico in cui i suoi componenti vengono depositati, degradati o modificati per delineare le funzioni e fornire una piattaforma in cui le cellule si attaccano per svolgere le loro funzioni specifiche, tra cui l'adesione, la proliferazione, la comunicazione e l'apoptosi. Finora, a questa coltura appartengono diversi tipi di modelli: la coltura basata su matrici aderenti naturali o sintetiche utilizzate per progettare scaffold 3D come biomateriali per formare una matrice 3D o basata su matrici non aderenti e/o prive di matrice per formare gli sferoidi.

Sono diversi i componenti della matrice extracellulare naturale che possono essere utilizzati come supporti nella coltura 3D, come matrigel, idrogel, supporti duri, e le diverse strategie di sintesi delle matrici 3D, come la liofilizzazione, l'elettrofilatura, la stereolitografia e il microfluido.

Le interazioni cellula-cellula e cellula-matrice non possono essere studiate in modelli 2D, a differenza dei modelli 3D che sono in grado di imitare queste condizioni in vitro. Pertanto, la coltura 3D fornisce un microambiente fisiopatologico pragmatico e svolge un ruolo potenziale nella scoperta di farmaci antitumorali a causa della mancanza di modelli preclinici pertinenti alle colture 2D. Gli inserti possono essere costituiti da biomateriali con proprietà simili alla composizione della matrice extracellulare (ECM) e le cellule possono anche produrre alcune proteine della ECM, come il collagene. Le differenze nelle proprietà fisiche e fisiologiche tra le colture 2D e 3D rendono le cellule 2D più sensibili agli effetti dei farmaci rispetto alle cellule 3D, poiché le cellule 2D non sono in grado di mantenere una morfologia normale come

le cellule 3D e a causa della diversa organizzazione dei recettori di superficie sulla cellula. Una coltura 3D appropriata fornisce quindi un approccio più fisiologicamente rilevante per l'analisi della funzione genica e del fenotipo cellulare *ex vivo*. Negli ultimi anni, la coltura 3D ricostruita è diventata un metodo di scelta per riassumere l'architettura tissutale di tumori benigni e maligni.

Il ruolo principale della coltura 3D è quindi quello di imitare la struttura della ECM del tessuto. L'ECM è un'impalcatura di proteine fibrillari non cellulari, varie macromolecole strutturali (proteine accessorie) e molecole adesive che forniscono supporto strutturale e biochimico alle cellule e sono essenziali per molti processi fondamentali. Inoltre, forma siti di legame cellulare che controllano l'adesione e la migrazione delle cellule. Da un punto di vista strutturale, è composta da:

- 1) la ECM interstiziale (stromale) contiene biomolecole che possono essere organizzate in due classi principali (proteine, glicoproteine) e proteoglicani (polisaccaridi). È costituita principalmente da diverse molecole proteiche, come il collagene I e III, polisaccaridi auto-organizzati in reti di fibre di glicosaminoglicani (GAG), come l'acido ialuronico (HA), il proteoglicano (PG) e la fibronectina;
- 2) la membrana basale, situata sul lato basale delle cellule epiteliali o endoteliali nei tessuti normali, che costituisce una barriera fisica tra le cellule epiteliali e il tessuto connettivo (stroma) dell'organo (consentendo sempre la diffusione dei gas e il trasporto delle molecole di segnalazione).

Queste caratteristiche e la composizione della ECM possono essere raggiunte con la coltura 3D, che può essere ottenuta sia attraverso strutture prive di scaffold (ad esempio, sferoidi) sia attraverso strutture basate su scaffold (ad esempio, supporti a base di idrogel e supporti a base di materiali polimerici duri). [2]

1.2 Scaffold

L'interazione tra le cellule e il loro ambiente è significativamente influenzata dall'architettura della matrice e dalle sue proprietà meccaniche e biochimiche.

Gli scaffold forniscono il supporto necessario per l'attaccamento e la crescita delle cellule all'interno di un ambiente tridimensionale, che alla fine produce l'autoassemblaggio e la formazione del tessuto ingegnerizzato. Le proprietà meccanica dello scaffold sono legate a fattori quali il materiale, la dimensione dei pori, il tasso di degradazione e la struttura, che determinano in larga misura i gradi di compattezza ed elasticità. È chiaro che scaffold con proprietà diverse influenzano in modo diverso il comportamento delle cellule e la qualità e la natura complessiva del prodotto.

Gli scaffold devono avere una rigidità, definita dal modulo di Young (E) che corrisponde alla pendenza del tratto elastico di una curva sforzo-deformazione, dove lo sforzo è definito come la forza per unità di area e la deformazione come la deformazione normalizzata indotta.

Le cellule mostrano risposte meccanotrasduttive, cioè la capacità di convertire uno stimolo meccanico applicato dall'esterno, sondando la rigidità del loro substrato, tra altri segnali meccanici esterni, e reagendo attraverso mediatori biochimici come il citoscheletro.

Considerando la grande influenza della rigidità dello scaffold sul comportamento delle cellule e sulla qualità del tessuto, sono stati sviluppati diversi metodi per controllare efficacemente la rigidità dello scaffold. La gamma di approcci comprende la manipolazione delle composizioni chimiche dello scaffold, l'applicazione di una tensione predeterminata, la modifica dell'architettura dello scaffold, la compressione del gel e varie tecniche di reticolazione. Va considerato che, oltre a influenzare la rigidità dello scaffold, tutte le tecniche influenzano anche altre caratteristiche dello scaffold. Ad esempio, la compressione del gel influenza sia la rigidità che la densità, mentre la reticolazione può modificare sia la rigidità che l'idrofilia.

Oltre alle tecniche di preparazione diretta dello scaffold, anche le cellule e le condizioni di coltura utilizzate nell'ingegneria tissutale possono alterare la rigidità dello scaffold sia in-vivo che in-vitro. Tali osservazioni possono essere attribuite a fattori di derivazione cellulare secreti dopo la semina e alla produzione di ECM. [2]

1.3 Geometria dello scaffold

L'influenza della matrice sulle cellule può essere mediata anche dalla geometria del substrato attraverso l'applicazione di gradienti di stress meccanico alle cellule.

Le cellule endoteliali seminate su perline rivestite di fibronectina (FN) di varie dimensioni hanno subito un aumento dell'apoptosi sulle perline di diametro inferiore, suggerendo l'influenza positiva della densità della ECM sulla sopravvivenza cellulare.

Un comportamento simile è stato osservato in un modello contenente "isole" di FN circondate da regioni non adesive; è stato osservato un aumento dell'apoptosi nelle aree a minore densità di ECM. Inoltre, questa tecnologia di stampa di modelli di substrato specifici ha dimostrato il ruolo delle indicazioni geometriche nella transizione tra crescita cellulare, apoptosi e programmi di differenziazione, suggerendo meccanismi meccanici che controllano questi processi.

Il riconoscimento del ruolo significativo della geometria del substrato sul comportamento delle cellule associate alla matrice ha portato allo sviluppo di diverse tecniche per la produzione di scaffold 3D a geometria definita. Le tecniche di microfabbricazione o le nanotecnologie, come la fotolitografia, la litografia a fascio di elettroni e l'elettrofilatura, sono i metodi più comunemente applicati per formare modelli 3D di interventi. Altri approcci prevedono la stampa indiretta, che utilizza stampi per la produzione di scaffold, la stampa 3D diretta, che crea lo scaffold durante il processo di stampa o la tecnologia di tessitura, per creare strutture uniche con micro o nanogeometria specifica e definita.

La geometria dello scaffold incoraggia le cellule a differenziarsi per creare tessuti specifici e, allo stesso tempo, funge da mimesi migliorata del microambiente naturale delle cellule, ossia la ECM, migliorando così il funzionamento delle cellule. [2]

1.4 Vincoli meccanici dello scaffold

La creazione di un tessuto 3D attraverso metodi di coltura cellulare è molto complessa e richiede un ambiente di coltura adeguato, tipicamente fornito da bioreattori. Sono stati progettati diversi tipi di bioreattori per consentire condizioni specifiche per migliorare la crescita dei tessuti. Oltre alla necessità di condizioni di coltura ideali per la modellazione dei tessuti, è stato dimostrato che specifiche stimolazioni meccaniche influenzano la funzionalità delle cellule, come riportato per diversi tipi di cellule, quali cellule vascolari, cellule progenitrici mesenchimali adulte ed embrionali, cellule polmonari, cellule ossee.

Ad esempio, i fibroblasti sottoposti a stiramento ciclico si riorientano a seconda della frequenza di stiramento. Pertanto, il ruolo dello scaffold è stato apprezzato come fonte di supporto e di stimoli meccanici per le cellule. Gli stimoli meccanici forniti durante la crescita del tessuto includono lo sforzo di taglio, la deformazione ciclica (uniassiale/biassiale), il fissaggio dello scaffold e il carico statico e dinamico, e hanno dimostrato di influenzare sia il comportamento delle cellule durante la formazione del tessuto sia le proprietà complessive del tessuto ingegnerizzato risultante. Per questo motivo, i bioreattori sono ora progettati per fornire stimoli meccanici allo scaffold e alle cellule durante la formazione del tessuto.

La fissazione dello scaffold fornisce un ulteriore mezzo per esaminare gli effetti dei vincoli meccanici sulle cellule associate.

Considerando gli effetti meccanici, le proprietà finali dello scaffold determineranno la probabilità di generare un nuovo tessuto soddisfacente e, in ultima analisi, detteranno le sue proprietà complessive. Una migliore comprensione degli effetti diretti delle proprietà dello scaffold sulle cellule seminate determinerà definizioni più accurate delle caratteristiche richieste agli scaffold per l'ingegneria di tessuti specifici. [2]

1.5 Struttura di scaffold 3D

Le cellule vengono coltivate in presenza di un supporto che può essere a base di idrogel e di materiali polimerici duri, naturali o sintetici, di origine animale o vegetale.

L'impalcatura polimerica offre una tridimensionalità favorevole al comportamento delle cellule nel microambiente. Il modello più utilizzato è l'idrogel a base di collagene grazie ai principali elementi costitutivi della membrana basale. Gli idrogel sono reti reticolate formate da polimeri idrofili attaccati attraverso interazioni fisiche, ioniche o covalenti.

Il loro carattere idrofilo permette di assorbire l'acqua che penetra successivamente tra le catene polimeriche e provoca il rigonfiamento e quindi la formazione dell'idrogel. Gli idrogel possono essere naturali (polimeri naturali), sintetici (polimeri sintetici) o ibridi (naturali e sintetici) a seconda del vantaggio della biocompatibilità o della natura fisico-chimica, rispettivamente.

Queste strutture modificate con polimeri possono essere utilizzate come matrice per la coltura cellulare in vitro o per realizzare sferoidi 3D. Il vantaggio principale degli idrogel è che le loro proprietà fisico-chimiche sono regolabili e possono imitare in modo appropriato le proprietà biochimiche e meccaniche della vera ECM nativa. Le cellule possono essere seminate in profondità in un idrogel poroso e ricavare facilmente nutrimento e ossigeno (per diffusione). [2]

1.6 Materiali utilizzati

Alcuni idrogeli utilizzati, come quelli di collagene, sono costosi, pertanto un'altra opzione è quella di lavorare con altri prodotti come gli idrogeli costituiti da nanofibre peptidiche.

La rigidità della coltura 3D può essere controllata regolando la concentrazione di idrogel. Soprattutto, questo sistema potrebbe essere applicato per studiare l'interazione tra qualsiasi tipo di cellule neoplastiche. Potrebbe anche essere possibile progettare sistemi più complessi utilizzando più di due tipi di cellule diverse.

Gli idrogel sono unici per la loro capacità di imitare la ECM e di permettere a fattori solubili come citochine e fattori di crescita di attraversare un gel simile a un tessuto.

Esistono diversi tipi di idrogel: naturali e sintetici.

I gel naturali (polimeri naturali) sono, ad esempio, il fibrinogeno, l'HA, il collagene, il matrigel, la gelatina, il chitosano e l'alginate. Gli idrogel sono, per definizione, reti composte da polimeri idrofili non reticolati, il che consente loro di gonfiarsi ampiamente grazie a legami covalenti o di essere tenuti insieme da attrazioni fisiche intramolecolari e intermolecolari, mantenendo la loro struttura 3D. Grazie al loro carattere idrofilo e idratato, possono assorbire una grande quantità (migliaia di punti percentuali) di acqua o fluidi biologici e gonfiarsi facilmente senza dissolversi, imitando così le strutture e le proprietà fisiche della ECM dei tessuti molli. Sono quindi morbidi e gommosi dopo il rigonfiamento e assomigliano ai tessuti viventi. D'altra parte, i gel differiscono dagli idrogel in quanto sono materiali semisolidi (possono apparire più solidi che liquidi) costituiti da polimeri idrofili che comprendono piccole quantità di solidi, dispersi in quantità relativamente elevate di liquido. A seconda della natura del polimero, gli idrogeli possono essere classificati in diverse categorie naturali o sintetiche e interconnessi da interazioni fisiche e ioniche e persino da legami covalenti (idrogeli basati su proteine ECM, idrogeli naturali e idrogeli sintetici) con proprietà biochimiche, fisiche e meccaniche distinte. Per questo motivo, sono stati esplorati anche come modelli 3D per la ricerca sul cancro.

Gli idrogeli a base di collagene sono idrogeli naturali. Il collagene, in quanto componente principale della ECM, svolge un ruolo chiave nello sviluppo e nella diffusione del cancro. Influisce sul microambiente tumorale, soprattutto nella segnalazione del cancro al seno, nella differenziazione e nella migrazione attraverso le interazioni cellula-matrice.

A seconda del tipo di tessuto, le fibrille di collagene si organizzano in vari modi per formare fibre di collagene adatte alle specifiche funzioni e proprietà dei tessuti.

Le proprietà meccaniche, l'architettura e la biodegradabilità degli idrogel di collagene possono essere finemente modulate regolando le loro concentrazioni e i parametri di preparazione. Grazie alla specificità dell'organizzazione spaziale e dell'autoassemblaggio del collagene in soluzioni acide, l'architettura degli idrogel può essere controllata mediante la manipolazione della forza ionica, del pH e della temperatura durante la polimerizzazione per gelo.

La concentrazione di collagene aumenta gradualmente con l'evaporazione regolata del solvente, oltre a modificare l'organizzazione delle molecole di collagene. La soluzione originale di collagene in una struttura idrogel solida (cioè la cosiddetta "transizione suolo/gelo") mantiene l'organizzazione molecolare delle molecole di collagene simile a quella dei tessuti delle molecole di collagene (fig. 2A). Inoltre, un aumento della concentrazione di collagene (cioè della forza ionica dei gel) porta a un aumento della densità delle fibre e a una riduzione delle dimensioni dei pori, ma non ha alcun effetto sul diametro delle fibre.

Al contrario, l'aumento della temperatura e del pH accelera la polimerizzazione, riduce il diametro delle fibre e la dimensione dei pori e aumenta le proprietà meccaniche dell'idrogel. Di conseguenza, sono stati sviluppati molti modelli 3D a base di collagene per la coltura del cancro in vitro.

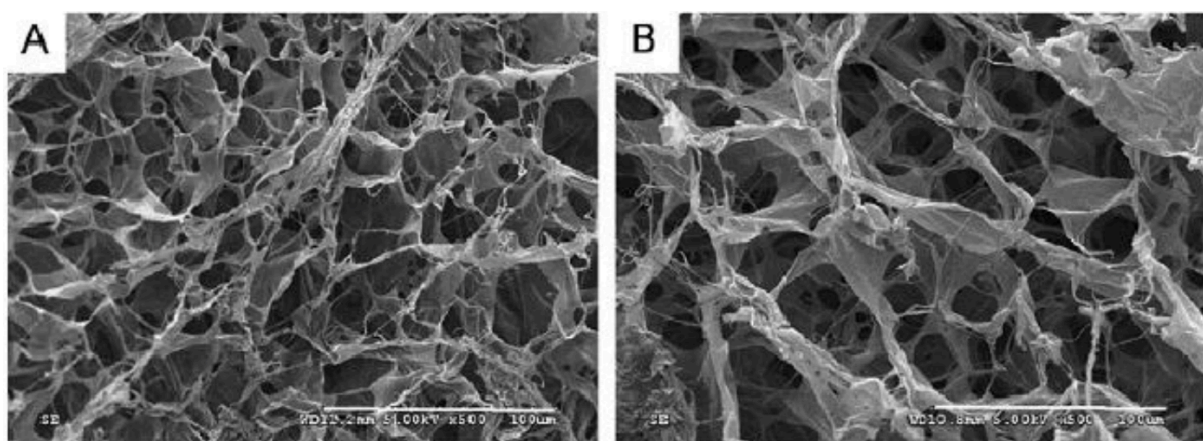


Fig. 2 Micrografie al microscopio elettronico a scansione di sezioni longitudinali di scaffold liofilizzati (A) a base di collagene e (B) a base di collagene-HA

Gli idrogeli a base di polisaccaridi sono idrogeli naturali. I proteoglicani (PG) hanno una proteina legata covalentemente a catene di GAG. Grazie al profilo polianionico dei GAG (dovuto ai gruppi solfato), essi attirano l'acqua, provocando così il rigonfiamento del GAG (fig. 2B). [2]

2. Tecniche di bioprinting

La bioprinting è una tecnologia di fabbricazione 3D utilizzata per dispensare con precisione biomateriali carichi di cellule per la costruzione di tessuti viventi funzionali 3D complessi o organi artificiali. Le strategie di bioprinting hanno dimostrato il loro potenziale utilizzo nella medicina rigenerativa per generare una varietà di tessuti. Tuttavia, gli attuali approcci di bioprinting presentano ancora sfide tecniche in termini di deposizione di cellule ad alta risoluzione, distribuzione controllata delle cellule, vascolarizzazione e innervazione all'interno di tessuti 3D complessi.

Le tre principali tecniche di bioprinting a getto d'inchiostro, laser assistito ed estrusione presentano ciascuna specifici punti di forza, debolezze e limitazioni.

1) Stampa a getto d'inchiostro

Una soluzione di pre-polimero idrogel con cellule incapsulate (chiamata bioinchiostro) viene conservata nella cartuccia di inchiostro. La cartuccia è quindi collegata a una testina di stampa e funge da fonte di bioinchiostro durante il processo di stampa controllato elettronicamente. Durante la stampa, le testine della stampante vengono deformate da un attuatore termico o piezoelettrico e schiacciate per generare gocce di dimensioni controllabili. Tuttavia, poiché le attuali testine di stampa sono basate su sistemi microelettromecanici (MEMS), la deformazione generata dall'attuazione termica o piezoelettrica all'apertura dell'ugello è relativamente piccola. Di conseguenza, le testine di stampa basate su MEMS non sono in grado di spremere materiali ad alta viscosità e non funzionano bene con bioink ad alta densità cellulare. L'alta densità cellulare aumenta la viscosità media dei bioink, con conseguente intasamento della testina.

Un altro svantaggio della stampa a getto d'inchiostro è l'effetto di sedimentazione. Quando i bioink vengono inizialmente caricati nella cartuccia d'inchiostro, sono ben miscelati. Nel corso dell'intero processo di stampa, tuttavia, le cellule iniziano a depositarsi nella cartuccia, aumentando la viscosità del bioink e spesso intasando la testina della stampante.

2) Stampa assistita da laser

La stampa laser-assistita è nata dalle tecnologie di scrittura diretta laser e di trasferimento indotto laser. La parte critica del sistema di stampa laser-assistita è uno strato donatore che risponde alla stimolazione laser. Lo strato donatore comprende una struttura a "nastro" contenente uno strato che assorbe energia (ad esempio, titanio o oro) nella parte superiore e uno strato di soluzione bioinchiostriata in sospensione nella parte inferiore. Durante la stampa, viene applicato un impulso laser focalizzato per stimolare una piccola area dello strato assorbente. Questo impulso laser vaporizza una parte dello strato donatore, creando una bolla ad alta pressione all'interfaccia dello strato di bioinchiostro e spingendo il bioinchiostro in sospensione. La goccia di bioink in caduta viene raccolta sul substrato ricevente e successivamente reticolata. Rispetto alla stampa a getto d'inchiostro, la stampa laser può evitare il contatto diretto tra il dispensatore e i bioink. Questo metodo di stampa senza contatto non causa stress meccanico alle cellule, il che si traduce in un'elevata vitalità cellulare (solitamente superiore al 95%). Inoltre, la stampa laser assistita può stampare anche materiali altamente viscosi e si possono utilizzare più tipi di bioink rispetto alla stampa a getto d'inchiostro.

3) Stampa a estrusione

La stampa a estrusione è una modifica della stampa a getto d'inchiostro. Per stampare i materiali viscosi che le stampanti a getto d'inchiostro non sono in grado di depositare, la stampa a estrusione utilizza una pompa ad aria compressa o uno stantuffo meccanico a vite per erogare i bioinchiostri. Applicando una forza continua, la stampa a estrusione può stampare linee cilindriche ininterrotte piuttosto che una singola goccia di bioink.

Quasi tutti i tipi di soluzioni di pre-polimeri idrogel di viscosità variabile e di aggregati ad alta densità cellulare possono essere stampati con bioprinters a estrusione. Se da un lato i bioprinters a estrusione possono stampare una gamma più ampia di materiali, dall'altro espongono le cellule incapsulate a maggiori sollecitazioni meccaniche che si ritiene riducano la vitalità cellulare. La bioprinting a estrusione offre una buona compatibilità con idrogeli foto-reticolabili, chimici e termici di viscosità molto diverse a un costo ragionevole. [3]

2.2 Modellazione e processo di stampa

Le biostampanti non possono stampare senza istruzioni. Per creare con successo tessuti bioprintati, è necessario generare i percorsi di stampa, selezionare i bioinchiostri appropriati, controllare la biostampante ed eseguire il controllo di qualità dopo la stampa.

Il tipico processo di bioprinting è il seguente:

- 1) i progettisti disegnano la geometria di stampa e ne verificano manualmente la fattibilità
- 2) i progettisti selezionano i tipi di cellule e gli idrogel appropriati e caricano i bioink nel sistema di bioprinting
- 3) attraverso linguaggi e protocolli di controllo, come RS 274 e LabView, i percorsi progettati vengono inviati al sistema di bioprinting
- 4) il bioprinter costruisce strutture depositando bioink sotto il controllo di un computer
- 5) i tessuti bioprintati vengono controllati manualmente tramite microscopia dopo il bioprinting.

Dopo il processo di bioprinting, i costrutti stampati con successo vengono trasferiti in un incubatore per la coltivazione. Il processo di bioprinting non è attualmente altamente automatizzato e le numerose operazioni manuali in diverse fasi possono comportare una bassa velocità di elaborazione e aumentare la possibilità di errori. Per garantire la qualità della stampa e migliorare il processo di stampa, molti ricercatori hanno studiato la tecnologia di progettazione e modellazione assistita da computer (CAD) per il bioprinting.

Queste tecniche CAD possono utilizzare sistemi di automazione informatica per assistere e accelerare il processo di progettazione.

I modelli di bioprinting, come i modelli utilizzati nella prototipazione rapida convenzionale, sono spesso convertiti nel formato di file STL (STereoLithography) come intermediario tra il modello e la generazione del percorso di stampa. Questi file contengono informazioni accurate sulla superficie di geometrie 3D complesse e possono essere progettati tramite interfacce utente grafiche o creati a partire da immagini cliniche, comprese quelle provenienti da risonanza magnetica (MRI) e tomografia computerizzata (CT). In un processo analogo al sezionamento istologico, i percorsi di stampa vengono creati "affettando" il modello STL in strati e creando percorsi utensile per biostampanti che tracciano il perimetro e le

caratteristiche interne di ciascuna fetta. Lo spessore di questi strati è spesso indicato come la risoluzione di una particolare stampante ed è solitamente compreso tra 100 e 500 μm , a seconda della macchina e del materiale utilizzato. Gli strati vengono formati in sequenza e impilati mentre il modello viene costruito in un processo additivo, formando un oggetto 3D da un insieme di strati 2D. A parità di condizioni, le risoluzioni più piccole sono associate a una qualità superiore e a tempi di stampa più lunghi.

Le immagini cliniche possono fornire informazioni sulla distribuzione dei tessuti in vivo dei pazienti e le geometrie dei tessuti anatomicamente realistiche possono essere determinate tramite l'elaborazione delle immagini.

Anche le tecniche assistite dal computer, note come bio-computer-aided-manufacturing (Bio-CAM), svolgono un ruolo importante durante e dopo il bioprinting.

Per la stampa a estrusione, sono state testate e modellate le relazioni tra pressione di erogazione, tempo di stampa e diametro dell'ugello. Gli effetti di sedimentazione delle cellule nelle stampanti a getto d'inchiostro, altamente correlati all'intasamento e alla viscosità, cambiano durante la stampa e sono stati modellati con metodi analitici e a elementi finiti (FEM). Per quanto riguarda la stampa laser, sono stati studiati gli effetti dell'energia laser, dello spessore del film di substrato e della viscosità dell'idrogel sulla vitalità delle cellule, nonché le dimensioni delle gocce, la differenziazione cellulare e la proliferazione cellulare. [3]

3. Cellule

La cellula è l'unità morfologica e fisiologica fondamentale degli organismi viventi vegetali ed animali, dai quali possiede tutte le proprietà: riproduzione, nutrimento, respirazione, accrescimento, capacità di sintesi, reattività agli stimoli e movimento. Le cellule degli organismi pluricellulari sono infatti capaci di vita autonoma, anche una volta separate dall'organismo al quale appartengono. Dal punto di vista fisico-chimico, le cellule sono costituite da un sistema colloidale eterogeneo e polifasico.

La sostanza vivente esiste a diversi livelli di organizzazione: le forme più semplici sono rappresentate dai batteri e da molte alghe; le forme più complesse sono le cellule tipiche degli eucalipti ai quali appartengono i protozoi ed i protofiti, veri e propri organismi unicellulari complessi, e gli organismi pluricellulari, incluso l'uomo.

I batteri o procarioti rappresentano il livello più elementare di organizzazione cellulare.

Dai batteri si passa ad un livello più elevato di organizzazione rappresentato dalle cellule superiori degli eucalipti, che sono caratterizzate da una complessa struttura interna e dalla suddivisione del protoplasma in due compartimenti distinti, separati dall'involucro nucleare: una porzione, in genere centrale, denominata nucleo ed una parte periferica definita citoplasma che avvolge il nucleo ed è delimitata dalla membrana plasmatica che circonda in superficie la cellula. Il nucleo contiene la cromatina, caratterizzata da una complessa organizzazione strutturale e dalla presenza di numerosi componenti molecolari oltre al DNA. Il citoplasma contiene una serie di organuli cellulari specializzati in specifiche funzioni ed altamente organizzati: mitocondri, reticolo endoplasmatico, apparato di Golgi, lisosomi.

Gli eucalipti possono essere organismi unicellulari, oppure costituire organismi pluricellulari. Questi ultimi sono formati dall'associazione di molte cellule tra loro.

Le varie cellule che compongono un organismo pluricellulare si specializzano per svolgere funzioni specifiche, cioè assumono determinate proprietà morfologiche e biochimiche che le rendono atte a svolgere le molteplici funzioni dell'organismo. Questa specializzazione morfologica e funzionale delle cellule prende il nome di differenziamento. Cellule con caratteri morfologici e funzionali simili si associano tra loro a costituire i tessuti.

Nonostante l'estrema specializzazione cellulare, tutte le cellule possiedono comunque caratteri strutturali e composizione chimica comuni, le cellule di organismi pluricellulari sono potenzialmente capaci di vita indipendente; questa proprietà è rilevata, tra l'altro, dalla

possibilità di coltivare in vitro cellule derivanti da tessuti, il che dimostra come cellule singole isolate dall'organismo siano capaci di sopravvivere e riprodursi in un mezzo di coltura e in condizioni ambientali idonei. [4]

3.2 Anatomia e fisiologia delle cellule

La forma varia nei diversi tipi cellulari. Alcune cellule, come ad esempio i leucociti e i macrofagi, presentano continui mutamenti di forma in rapporto alla loro attività funzionale. Come già accennato, negli organismi pluricellulari le cellule si organizzano a costituire delle aggregazioni definite tessuti. I diversi tessuti hanno ciascuno un'architettura caratteristica, finalizzata a svolgere in maniera ottimale le specifiche funzioni alle quali le cellule che li costituiscono sono dedicate. La maggior parte delle cellule, quando sono sospese in un liquido, assumono forma sferica per effetto della tensione superficiale. Le cellule dei vari tessuti solidi hanno invece spesso forma molto diversa da quella sferica, per effetto di diversi fattori tra cui soprattutto la pressione reciproca esercitata dalle cellule contigue e la funzione preferenzialmente acquisita in seguito al differenziamento cellulare.

Si possono così avere cellule piatte, cubiche, cilindriche, prismatiche, provviste di prolungamenti, a forma di cilindri striati trasversalmente. Anche le dimensioni delle cellule variano entro limiti piuttosto ampi.

Le cellule degli organismi pluricellulari presentano un piano organizzativo comune.

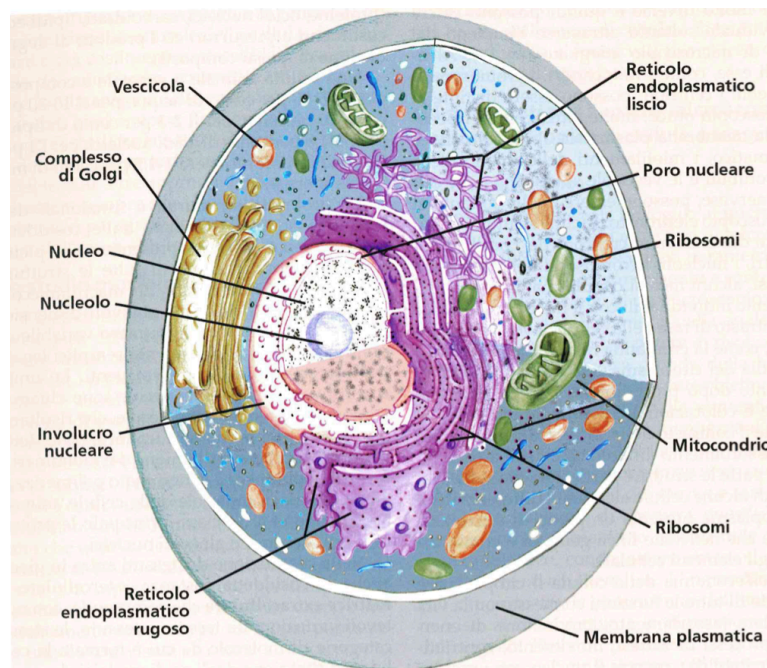


Fig. 3 rappresentazione schematica generale dell'organizzazione di una cellula eucariotica

La fig.3 illustra schematicamente la struttura di una cella. Il nucleo è situato di solito centralmente ma può assumere, in determinati tipi cellulari, una posizione eccentrica.

È generalmente unico, tuttavia alcuni tipi cellulari sono polinucleati. La forma del nucleo è correlata con quella della cellula, ma in alcuni casi può essere completamente irregolare.

Le dimensioni del nucleo sono variabili, ma in genere sono regolate secondo un rapporto nucleo-plasmatico che tende a mantenersi costante intorno ad un certo valore caratteristico per ciascun tipo cellulare. Il nucleo è delimitato da un involucro membranoso, l'involucro nucleare, che lo separa dal citoplasma e contiene una sostanza particolare molto colloso detta cromatina ed uno o più orfanelli sferici denominati nucleoli che si differenziano dalla cromatina per alcune proprietà tintoria e per la composizione chimica. La cromatina rappresenta lo stato interfase (cellula a riposo proliferativo) dei cromosomi, che sono i portatori dei caratteri ereditari o geni. I cromosomi sono chiaramente visibili come singoli bastoncelli soltanto durante la divisione cellulare. Essi sono costanti per numero, forma e dimensioni in ciascuna specie. Contengono l'acido deossiribonucleico (DNA) che è la sostanza costitutiva dei geni. La cellula è circondata in superficie dalla membrana plasmatica o cellulare che regola gli scambi con l'ambiente esterno. Il citoplasma appare nella cellula vivente come un corpo amorfo e omogeneo, il citoplasma fondamentale o ialoplasma, nel quale sono immerse particelle e organuli rifrangenti, quali i mitocondri, i centrioli ed inclusioni di varia natura. Il citoplasma fondamentale che al microscopio ottico appare omogeneo, cioè privo di struttura, mostra invece, quando è esaminato al microscopio elettronico, la presenza di ulteriori organuli di dimensioni submicroscopiche ma di grande importanza nelle funzioni cellulari.

I corpi inclusi nel citoplasma possono essere classificati in tre categorie:

- gli organuli che sono comuni a quasi tutte le cellule essendo deputati a svolgere le funzioni fondamentali della vita: il reticolo endoplasmatico, i ribosomi, il complesso di Golgi, i mitocondri, i lisosomi, i centrioli, il fuso mitotico, i microtubuli;
- le strutture specifiche di alcuni tipi cellulari, specializzate a svolgere funzioni particolari, come le miofibrille nelle fibre muscolari striate che hanno funzione contrattile, le neurofibrille nelle cellule nervose, le tonofibrille negli epiteliali, ecc.;

- le inclusioni che sono depositi di sostanze di varia natura che non fanno parte integrate della sostanza vivente, ma costituiscono materiale nutritivo di ricerca o di protezione o sostanze destinate ad essere secrete all'esterno della cellula.

Dal punto di vista chimico, in aggiunta ad un'alta percentuale di acqua, l'analisi del citoplasma rivela la presenza di sostanze inorganiche ed organiche e di una quantità innumerevole di macromolecole complesse, dei loro costituenti e di prodotti di degradazione che nell'insieme formano il cosiddetto pool solubile. I componenti chimici della cellula possono essere classificati in componenti inorganici e componenti organici.

Le proprietà strutturali e funzionali della cella sono determinate dalle cosiddette macromolecole che rappresentano le pietre costruttive fondamentali di tutte le strutture cellulari ed extracellulari. [4]

3.3 Studio morfologico

I metodi di osservazione morfologica o microscopica delle cellule e dei tessuti possono essere innanzitutto classificati in due ordini generali: i metodi per l'osservazione diretta di cellule e tessuti viventi ed i metodi per l'osservazione di preparati fissati e colorati. I primi danno un'immagine reale e dinamica delle cellule e dovrebbero essere in linea teorica preferiti ai secondi. Tuttavia, i metodi per l'osservazione di cellule e tessuti viventi presentano molte limitazioni, prima fra tutte il fatto che quando le cellule o frammenti di tessuto sono isolati dall'organismo di cui fanno parte non sopravvivono che per tempi brevi, eccetto quando sono coltivati in vitro.

L'esame di materiale biologico al microscopio ottico, come in ogni altro tipo di microscopio, è condizionato dai seguenti parametri: potere di risoluzione, ingrandimento e contrasto.

Il potere di risoluzione di un microscopio è definito come la distanza minima alla quale due punti risultano distinti. Il potere di risoluzione dipende dalla lunghezza d'onda della luce e dall'apertura numerica della lente obiettivo del microscopio.

L'ingrandimento è il rapporto tra la dimensione dell'immagine vista al microscopio e la dimensione reale dell'oggetto. Dei due parametri è il più importante il potere di risoluzione. Data una certa risoluzione, l'ingrandimento dell'immagine diventa un'operazione utile per assicurare che tutti i dettagli risolti possano essere facilmente riconosciuti.

Il microscopio ottico è basato sul principio che un fascio di luce attraversa la struttura da studiare e l'immagine così ottenuta giunge ingrandita all'occhio dell'osservatore.

Per ottenere questo risultato occorre che il materiale da studiare sia attraversabile dalla luce e non vi siano sovrapposizioni tra più cellule. [4]

3.4 Cellule tumorali

Le cellule cancerose rompono le regole più basilari del comportamento delle cellule secondo le quali gli organismi multicellulari sono costruiti e mantenuti, ed esse sfruttano ogni tipo di opportunità per farlo.

Le cellule cancerose sono definite da due proprietà ereditate: loro e la loro progenie si riproducono senza rispettare le normali limitazioni sulla divisione cellulare e invadendo e colonizzando territori normalmente riservati ad altre cellule. Una cellula anomala isolata che non prolifera più di quelle vicine non crea danni significativi, ma se la sua proliferazione è incontrollata, darà origine ad un tumore, o neoplasia (una massa di cellule anomali che cresce inesorabilmente). Finché quest'ultime restano raggruppate insieme in una singola massa, si dice che il tumore è benigno, invece si considera maligno quando le sue cellule hanno acquisito la capacità di invadere tessuti circostanti. L'invasività ha la capacità di formare tumori secondari, chiamati metastasi.

Il cancro viene classificato secondo il tessuto e il tipo di cellula da cui derivano. [5]

3.5 Morte cellulare programmata (apoptosi)

Le cellule di un organismo multicellulare sono membri di una comunità organizzata.

Se delle cellule non sono più necessarie, queste si suicidano attivando un programma intracellulare di morte. Questo processo è perciò chiamato morte cellulare programmata, o apoptosi. Le cellule che muoiono come risultato di un danno acuto tipicamente si rigonfiano e scoppiano, versando il loro contenuto su tutte le cellule vicine, processo chiamato necrosi, provocando una risposta infiammatoria dannosa. Una cellula che, invece, subisce l'apoptosi muore senza danneggiare i suoi vicini. La cellula si raggrinzisce e si condensa. Il citoscheletro collassa, l'involucro nucleare si disassembla e il DNA nucleare si rompe in frammenti

Cosa più importante, la superficie cellulare si altera, mostrando proprietà che causano la rapida fagocitosi della cellula morente, da parte di una cellula circostante oppure da parte di un macrofago. [5]

I cambiamenti morfologici delle cellule possono essere osservati in dettaglio con la microscopia elettronica, mentre la scissione della cromatina è ben rilevata sia con tecniche elettroforetiche che con la citometria a flusso, utilizzando vari fluorocromi in grado di legare specificamente il DNA a doppio filamento. [6]

3.6 Estratto di fragole

La capacità antiossidante dei frutti a bacca rossa è un indicatore della presenza di sostanze bioattive, responsabili del potenziale effetto benefico per la salute e della prevenzione di patologie come il cancro. Il valore della capacità antiossidante è strettamente correlato alla presenza di sostanze, come la vitamina C e i composti fenolici.

I polifenoli, presenti nella fragola, hanno la capacità di modulare la segnalazione cellulare, di conseguenza questa loro capacità è stata presa in considerazione come uno dei meccanismi d'azione nell'inibizione dell'iniziazione del cancro.

I fenoli inibiscono la proliferazione di queste cellule attraverso la demetilazione dei geni oncosoppressori (svolgono un ruolo chiave nel controllo della crescita e nella prevenzione della formazione dei tumori) che inducono l'arresto del ciclo cellulare e l'apoptosi.

4. Microscopia elettronica

Le cellule ed i tessuti possono essere studiati a diversi livelli: morfologico, biochimico e funzionale. L'analisi morfologica o strutturale si prefigge di conoscere la forma, le dimensioni, la distribuzione e in generale l'organizzazione strutturale della cellula.

Essa si avvale dei microscopi, strumenti atti ad ingrandire le dimensioni delle strutture da studiare. I metodi di osservazione morfologica o microscopica delle cellule e dei tessuti possono essere classificati in: metodi per l'osservazione diretta e metodi per l'osservazione di preparati fissati e colorati. Tra i più utilizzati troviamo il microscopio ottico (fig. 4A), il microscopio elettronico a trasmissione (TEM) (fig. 4B) e il microscopio elettronico a scansione (SEM) (fig. 4C).

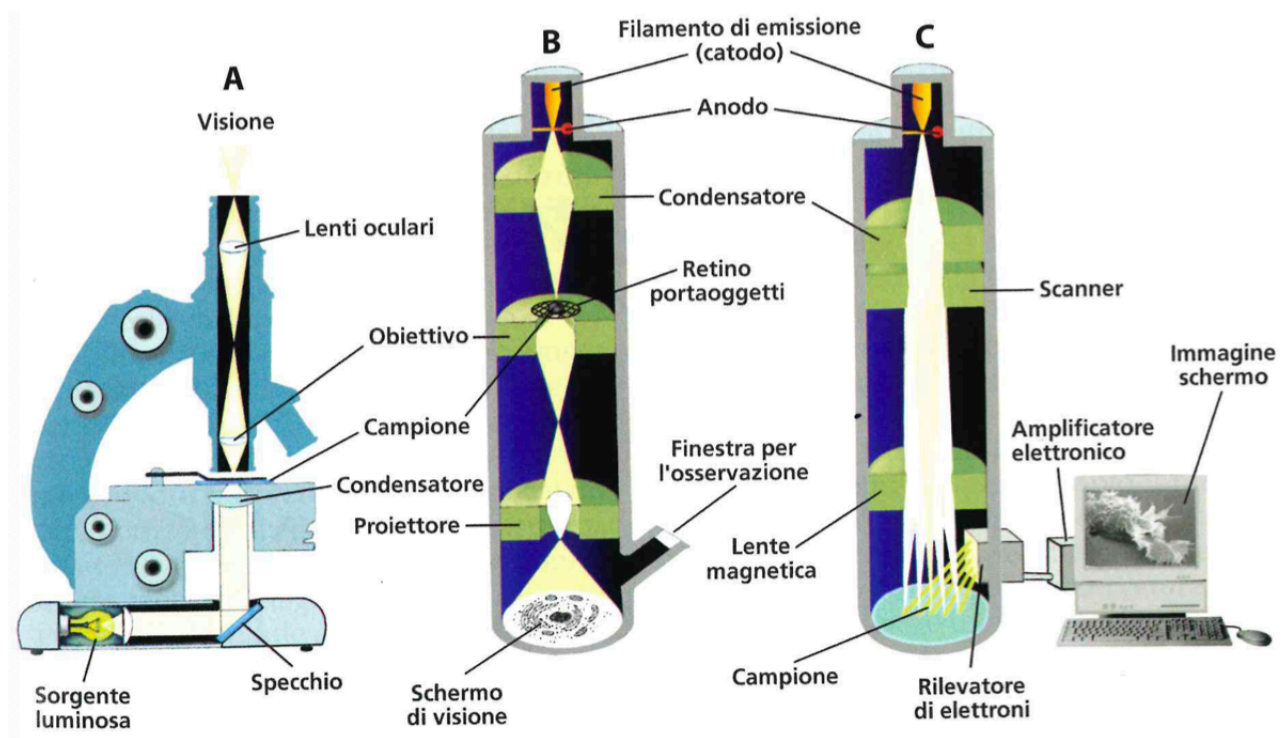


Fig. 4 Schema raffigurante tre tipi di microscopio: ottico, elettronico a trasmissione e a scansione

Il microscopio ottico non consente di studiare tutta una serie di complesso sopramolecolari che costituiscono la cosiddetta ultrastuttura dei tessuti. L'avvento della microscopia elettronica è stato una delle più importanti conquiste della citologia ed ha consentito di riconoscere nella cellula un complesso sistema di strutture altamente organizzate, di dimensioni estremamente piccole, sino ad allora sconosciute, gettando un ponte tra la morfologia tradizionale e la biologia molecolare. [8]

La microscopia elettronica permette di ottenere informazioni sulla morfologia, sulla struttura e sulla composizione dei materiali, dopo un'opportuna preparazione dei campioni da osservare, tramite l'analisi dell'interazione elettrone-materia. Per ottenere immagini ingrandite di oggetti microscopici è necessario illuminarle tramite un fascio di particelle cariche (elettroni) al posto di un fascio di luce (fotoni), grazie a questo principio una particella si può comportare come un'onda e può quindi essere usata in microscopia.

Tale principio è basato sulle osservazioni seguenti:

- 1) La natura ondulatoria dell'elettrone, espressa dalla relazione di De Broglie (1924):

$$\lambda = \frac{h}{mv}$$

dove λ è la lunghezza d'onda associata alla particella, h è la costante di Planck e mv è la quantità di moto della particella

- 2) L'identità tra i principi variazionali di Maupertuis e di Fermat: il primo fornisce la regola del cammino di una particella in un campo di forza, mentre il secondo governa il cammino di un fascio luminoso attraverso mezzi materiali, che possono dare origine a riflessioni e rifrazioni.

- 3) La deflessione del cammino di un fascio di elettroni attraverso campi elettrici e magnetici è del tutto analoga alla rifrazione operata dalle lenti ottiche su un fascio luminoso.

Il principale vantaggio nell'usare elettroni al posto di luce visibile in microscopia è il grande guadagno nella risoluzione spaziale, definita come la minima distanza tra due punti visti come distinti dallo strumento o la dimensione del più piccolo oggetto che può essere visto. [9]

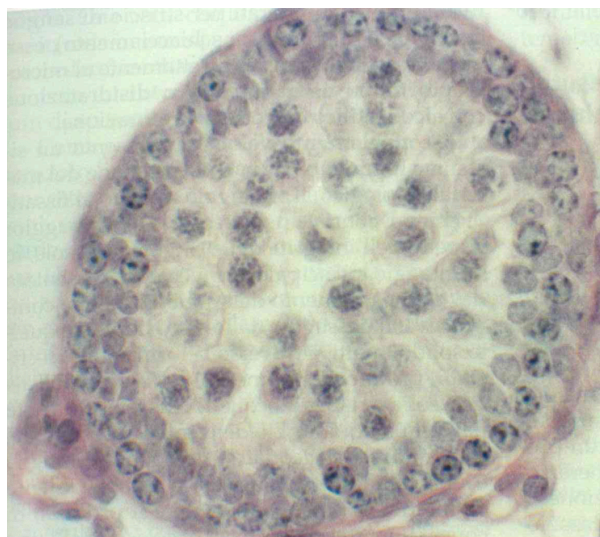


Fig. 5 Sezione di tubolo seminifero

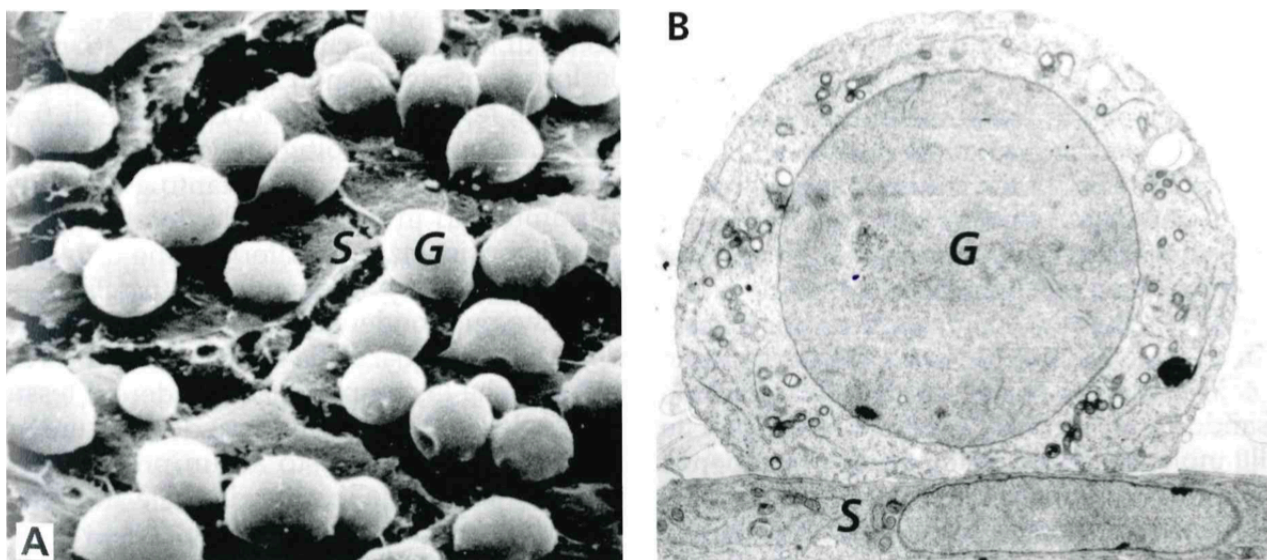


Fig. 6 Fotografia al microscopio elettronico a scansione (A) e al microscopio elettronico a trasmissione (B) di cellule germinali di topo (G) e di cellule del Sertoli (S) coltivate in vitro.

La fig. 5 rappresenta il dettaglio ottenibile al microscopio ottico, mentre la fig. 6 raffigura il livello di risoluzione ottenibile con uno studio in cui vengono utilizzate due diverse tipologie di microscopio elettronico.

Il microscopio elettronico è basato sull'uso di un fascio di elettroni anziché di un fascio di luce visibile, come nel microscopio ottico. Gli elettroni sono emessi da un filamento di tungsteno (catodo) e vengono accelerati nel vuoto da un potenziale elettrico: le lenti sono

sostituite da un campo elettrostatico o elettromagnetico che ha l'effetto di deflettere gli elettroni, così come un raggio di luce è rifratto quando attraversa una lente.

L'immagine prodotta può essere visualizzata su uno schermo fluorescente oppure può essere registrata attraverso acquisizione digitale. Il limite teorico di risoluzione del microscopio elettronico è tra 0,3-0,5 nm, ma in pratica è, nelle condizioni ottimali, dell'ordine di 0,7-1 nm con materiale biologico, in contrapposizione ad un limite di risoluzione di 0,25 μ m del microscopio ottico. Un potere di risoluzione così elevato permette ingrandimenti fotografici fino a 1.000.000 di volte. Esistono due tipi di microscopia elettronica quello a trasmissione (TEM) e quello a scansione (SEM). Il SEM ha potere risolutivo più basso rispetto al TEM ma consente di valutare il rilievo degli oggetti.

La differenza tra i due tipi di microscopia elettronica consiste in sostanza nel fatto che il TEM fornisce un'immagine che deriva dall'attraversamento delle strutture biologiche da parte degli elettroni, mentre il SEM è basato sul principio di un'immagine riflessa derivante dal rimbalzare degli elettroni sulla superficie del campione in osservazione. [8]

4.2 Le origini

Il microscopio a elettrone scansionante (SEM) trova le sue origini nell'idea di Von Ardenne di aggiungere ad un TEM bobine che permettessero di scansionare il campione, deviando il fascio grazie alla forza di Lorentz. Questo primo dispositivo era però solamente in grado di riprodurre l'immagine scansionata su una lastra fotografica. Un primo esempio di strumento moderno venne invece proposto da Zworykin, il quale aggiunse ai precedenti dispositivi un display a raggi catodici e un rivelatore di elettroni secondari, riuscendo così a ottenere una risoluzione spaziale di 5nm. La prima versione commerciale del SEM si deve alla Cambridge Scientific Instruments, dove grazie al lavoro di Oatley nel 1965 venne prodotto il SEM Mark I Stereoscan. [11]

4.3 Conservazione dei campioni e preparazione dei preparati

Le cellule dei tessuti non possono sopravvivere a lungo al di fuori dell'organismo da cui sono state prelevate; sia perché non sussistono più le corrette condizioni ambientali (temperatura, umidità, pH...), sia perché, venendo meno la difesa costituita dal sistema immunitario dell'organismo, i tessuti vengono invasi da microrganismi presenti nell'ambiente.

Si instaura quindi un processo di progressiva alterazione e degenerazione che si conclude con la decomposizione. È ovvio che chi intende studiare l'organizzazione dei tessuti deve evitare qualsiasi alterazione della loro struttura originaria.

Dall'invenzione del microscopio sono state messe a punto una serie di procedure, definite con il termine di fissazione, che tendono a conservare la struttura di campioni biologici mantenendo inalterate la loro organizzazione originaria. La fissazione deve essere effettuata immediatamente dopo il prelievo dell'organismo o il più precocemente possibile e prima di qualsiasi altro trattamento ed implica necessariamente la morte delle cellule in maniera rapida e la denaturazione delle proteine, comprese gli enzimi litici.

Tali trattamenti puntano anche a rendere insolubili le macromolecole presenti, mantenendole localizzate nelle strutture di cui fanno parte. Esistono molteplici fissativi che obbediscono a vari criteri, tra i quali: la maggiore o minore velocità di penetrazione nei tessuti, la capacità di salvaguardare alcune attività enzimatiche che si vogliono studiare, la particolare affinità per alcune strutture. Tra i più usati gli alcoli etilico e metilico e le aldeidi, in particolare formaldeide per microscopia elettronica. Queste ultime formano infatti legami crociati tra catene fissando in un reticolo le posizioni reciproche delle molecole stesse. Il tempo di permanenza nel liquido di fissazione varia da pochi minuti a uno o due giorni a seconda della dimensione del frammento, del tipo di tessuto e del fissativo impiegato.

Il congelamento veloce rappresenta un sistema alternativo per la conservazione del materiale biologico. Il vantaggio rispetto ai fissativi chimici consiste nella rapidità e nel maggior rispetto dell'integrità delle singole molecole, lo svantaggio principale è invece rappresentato dal danneggiamento dell'organizzazione complessiva. Il passaggio dallo stato liquido a quello solido produce un aumento di volume dell'acqua solida rispetto a quello che era occupato dall'acqua liquida. Ciò determina la rottura del contenitore dell'acqua.

Più rapido è il processo di congelamento, più piccoli sono i cristalli che si formano e minori sono i danni. Per questo motivo il metodo d'elezione è quello dell'immersione di piccoli

volumi di materiale biologico in azoto liquido con un congelamento pressoché istantaneo. Questo metodo è talmente efficiente che può essere usato anche per conservare cellule vive le quali, una volta scongelate, possono riprendere le loro normali attività. I frammenti di tessuto o di organo, una volta fissati, per poter essere osservati al microscopio debbono essere sezionati in sezioni sottili di 3-10 μm di spessore, utilizzando il microtomo. Non è però possibile effettuare sezioni così sottili di tessuti fissati, in quanto la loro consistenza non lo consente. Per risolvere questo problema si procede ad includere il frammento in un materiale dotato dell'adeguata consistenza. Il materiale che a tale scopo si usa più comunemente è la paraffina. Per rendere il tessuto miscibile con la paraffina esso deve essere sottoposto ad un procedimento di sostituzione dell'acqua, di cui è impiegato, prima con l'alcool etilico e successivamente con un solvente della paraffina stessa, come lo xilolo. Una volta che la paraffina ed il campione in essa immersa, si sono solidificati, si può procedere al sezionamento di 3-10 μm di spessore. In realtà questo tipo di processo viene effettuato per lo studio al TEM, invece per quanto riguarda l'osservazione al SEM, dovendo ottenere un'immagine tridimensionale della superficie, il materiale non viene tagliato ma viene trattato con oro vaporizzato per renderlo conduttivo. [8]

I campioni preparati per l'analisi al SEM sono resi conduttivi mediante la ricopertura della superficie con uno strato ultrasottile (nm) di oro. In modo tale che quando i campioni interagiscono con il fascio elettronico ad alta energia restituiscono un segnale di elettroni secondari (SE) in grado di produrre un'immagine tridimensionale ad alta risoluzione dell'ultrastruttura superficiale del campione. [10]

4.4 Come rendere visibili le cellule

Nel contenuto della maggior parte delle cellule, composte dal 70% di acqua, c'è ben poco che possa impedire il passaggio di raggi luminosi. Così, la maggior parte delle cellule nel loro stato naturale, anche se fissate e sezionate, è quasi invisibile in un microscopio ottico ordinario perché completamente attraversabili dai raggi di luce. [4]

Un modo per renderle visibili è quello di colorare con dei coloranti, per questo motivo sono state individuate una serie di sostanze capaci di colorare varie porzioni della cellula, rendendola così visibili. Alcuni di questi coloranti, coloravano tessuti biologici e mostravano spesso una preferenza per parti particolari della cellula rendono queste strutture chiaramente visibili.

La maggior parte dei coloranti usati in istologia è rappresentata da molecole idrosolubili e quindi disciolte in acqua. Le sezioni da colorare sono imbevute di paraffina e perciò impermeabili all'acqua in cui i coloranti sono disciolti. Per colorare le sezioni occorre quindi eliminare la paraffina, con l'uso di xilolo, e reidratare il tessuto attraverso un progressivo passaggio in alcool etilico sempre più diluito in acqua, fino ad immergerle in acqua.

Per molti di questi coloranti si conosce il carattere, genericamente elettrostatico, del legame. Vengono impiegate miscele di vari coloranti per mettere in evidenza i diversi costituenti delle cellule e dei tessuti. La combinazione più impiegata è la miscela ematossilina-eosina nella quale l'ematossilina colora in blu la cromatina del nucleo, invece l'eosina colora in varie gradazioni di rosa-rosso alcune parti del citoplasma. [8]

4.5 Struttura e funzionamento

Un SEM si può considerare come costituito da due parti principali, la colonna, dove sono contenute le ottiche elettroniche e i rivelatori, e la console che comprende il quadro dei comandi, il display e il calcolatore. Un esempio della struttura di un SEM si può trovare in fig. 7

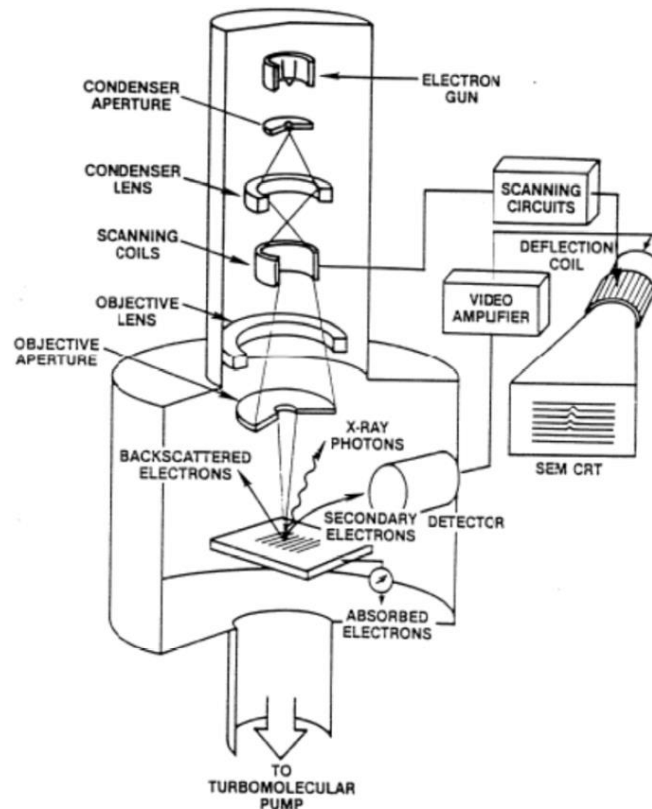


Fig. 7 Schematizzazione dei componenti di un SEM

Il fascio di elettroni può essere generato per emissione termoionica da un filamento di Tungsteno o di Esaboruro di Lantanio, oppure per emissione di campo; gli elettroni così prodotti vengono poi accelerati dal campo elettrico che si ha tra catodo (il filamento) e anodo, che possono trovarsi a una differenza di potenziale che varia in genere tra i 500V e i 30kV, raggiungendo energie comprese tra i 500eV e i 30keV. Il fascio viene poi foccheggiato grazie a lenti che possono essere sia elettrostatiche o elettromagnetiche, ma che nei moderni SEM sono generalmente di tipo elettromagnetico.

In generale l'ultima lente, la lente obiettivo, è posizionata secondo una geometria a diaframma, che consente di mettere a fuoco il campione al di là di essa così da consentire un

facile accesso allo stesso. Nei moderni SEM vengono invece usate lenti ad immersione, che danno ottimi risultati ma rendono difficile l'accesso al campione in quanto deve trovarsi all'interno della lente stessa, oppure si utilizzano lenti di tipo snorkel, il cui campo magnetico avvolge il campione che però si trova al di fuori di essa, unendo così alte prestazioni e comodità di utilizzo. Unite alle lenti obiettivo si hanno inoltre le bobine per la scansione, che permettono di direzionare il fascio lungo il campione; una coppia di esse devia il fascio di un angolo θ rispetto alla verticale, mentre un'altra lo devia di un angolo 2θ nella direzione opposta, così da non limitare l'area di scansione.

Una volta avvenuta l'interazione tra fascio di elettroni e campione, si possono ricavare informazioni su di esso grazie a vari tipi di rivelatori, i segnali ottenuti da questi vengono infine visualizzati su di un display ed è inoltre possibile salvare le informazioni in forma di array bidimensionale di dati. [12]

4.6 Modalità di funzionamento

Esistono tre principali modalità di funzionamento, imaging di elettroni secondari, di elettroni retrodiffusi e microanalisi di raggi X (EDX). Dagli elettroni secondari si possono ricavare informazioni generalmente limitate alla morfologica superficiale; dagli elettroni retrodiffusi si ottengono invece informazioni da una profondità maggiore e legate anche alle differenze nella composizione del campione; infine, i raggi X sono utili per determinare la composizione atomica del campione.

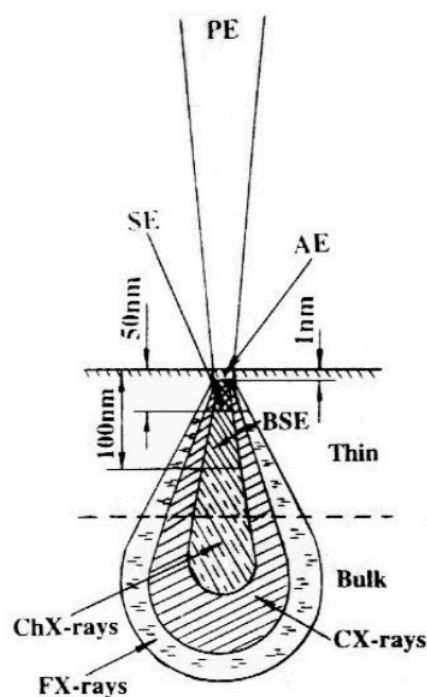


Fig.8 Schema del volume di interazione del fascio elettronico

In fig. 8 sono indicate le zone da cui hanno origine elettroni primari (PE), elettroni secondari (SE), elettroni retrodiffusi (BSE), elettroni Auger (AE), raggi X continui (CX-rays), raggi X caratteristici (ChX-rays) e raggi x secondari di fluorescenza (FX-rays).

La modalità di funzionamento principale dei microscopi a elettrone scansionante è quella ad elettroni secondari. Gli elettroni secondari vengono emessi dagli atomi del campione a seguito dell'interazione con il fascio di elettroni; per via delle loro energie (generalmente comprese tra 0 eV e 50 eV), lo spessore del campione, dal quale possono emergere, varia tra 3 e 10 nm;

da essi si ricavano quindi informazioni principalmente legate alla morfologia superficiale, che risultano essere di facile interpretazione, questo è il motivo per cui la modalità ad elettroni secondari sia la più diffusa tra i SEM.

Esistono due tipi di elettroni secondari, la distinzione tra i due tipi viene fatta in base alla provenienza degli elettroni che causano la loro emissione. Gli elettroni secondari di primo tipo sono quelli che vengono generati da atomi eccitati da elettroni provenienti direttamente dal fascio principale, si generano alla superficie del campione e contengono quindi informazioni ad alta risoluzione sulla morfologia superficiale; gli elettroni secondari di secondo tipo sono generati a causa dell'eccitazione di elettroni retrodiffusi, che provengono quindi da una regione del campione profonda fino a 1 μm e portano informazioni a bassa risoluzione. Questi due tipi di elettroni secondari si trovano nello stesso range di energie e hanno proprietà del tutto simili quindi non possono essere distinti dai rivelatori che producono un unico segnale dovuto a entrambi. A causa della loro origine, il segnale dovuto agli elettroni secondari di primo tipo dipende dall'area di scansione, mentre quello dovuto agli elettroni secondari di secondo tipo è indipendente da essa, questi ultimi elettroni generano un segnale di sottofondo a bassa risoluzione che può essere da due a tre volte più intenso di quello ad alta risoluzione, ha quindi l'effetto di diminuire la qualità generale del segnale.

Gli elettroni retrodiffusi sono quelli che hanno energie comprese tra 50 eV e l'energia del fascio incidente. Questi elettroni non vengono emessi dal campione, ma sono gli elettroni stessi del fascio incidente che interagiscono con i nuclei degli atomi del campione che vengono diffusi ad angoli vicini a 180° . Il tasso di elettroni retrodiffusi, rispetto agli elettroni incidenti, aumenta all'aumentare del numero atomico, poiché aumentano le dimensioni del nucleo e così anche la sezione d'urto.

Il numero di elettroni retrodiffusi, in particolare alle alte energie del fascio, è maggiore di quello degli elettroni secondari. Nonostante ciò, è sempre stato fatto un minore utilizzo degli elettroni retrodiffusi, per via della maggiore difficoltà nel rivelarli e per la minore intuitività delle immagini da essi ottenute. Infatti, per via delle loro alte energie, risulta più difficile deviarli verso il rivelatore; inoltre le immagini che ne risultano, non contenendo soltanto informazioni sulla morfologia superficiale, risultano essere di più difficile lettura.

Il vantaggio principale che si ha nell'utilizzo degli elettroni retrodiffusi è dovuto alla loro sensibilità al numero atomico. Poiché l'intensità rilevata dipende da Z (numero atomico), è possibile distinguere qualitativamente zone del campione composte da atomi di elementi differenti. Inoltre, essendo le energie degli elettroni retrodiffusi maggiori di quelle degli elettroni secondari, essi riescono ad emergere da uno strato superficiale più spesso, portando informazioni relative non solo alla morfologia superficiale, ma anche alla struttura degli strati immediatamente al di sotto della superficie. Il range R (nm) dal quale emergono gli elettroni retrodiffusi è dato dalla formula $R = \frac{75E_0^{5/3}}{\rho}$ dove E_0 è l'energia del fascio in keV e ρ è la densità del campione in g/cm^3 ; risulta quindi che gli elettroni retrodiffusi portano informazioni su uno strato di circa un micron (μ), questo però a spese della risoluzione spaziale, anch'essa dello stesso ordine di grandezza.

Un'informazione che solo gli elettroni retrodiffusi possono dare è quella relativa alla struttura cristallina del campione. Se la direzione del fascio incidente coincide con un'orientazione cristallografica del campione, si ottiene una maggiore penetrazione del fascio elettronico, per cui gli elettroni riescono più difficilmente a riemergere e di conseguenza l'intensità del segnale dei retrodiffusi ne risulta attenuata. Variando l'angolazione del fascio incidente rispetto al campione è possibile risalire alla sua struttura cristallina. [12]

4.7 Immagini

Le immagini fornite dal SEM presentano una analogia sostanzialmente invertita rispetto a quelle ottenute con un microscopio ottico a riflessione.

Le immagini ottenibili al SEM possono essere classificate nella maniera di seguito descritta.

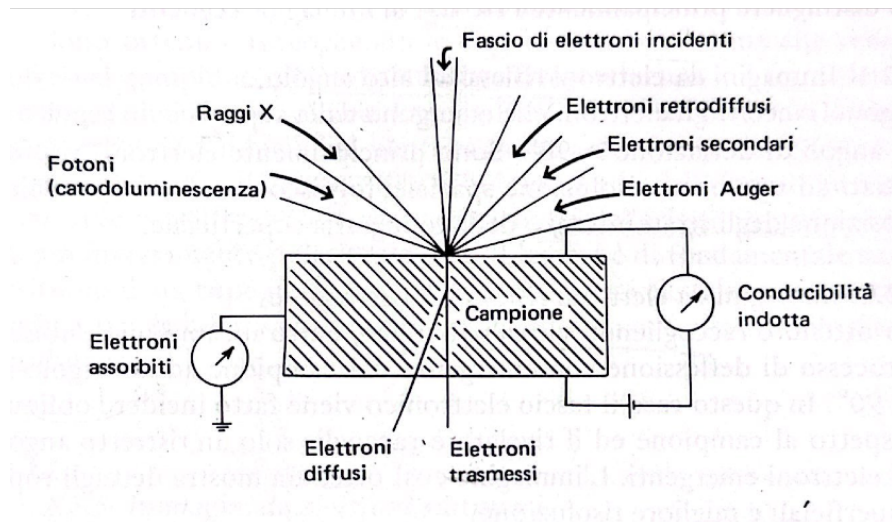


Fig. 9 diversi tipi di segnali

- le immagini che vengono fornite dagli elettroni secondari (SEI) sono quelle più frequentemente utilizzate per lo studio della morfologia superficiale. Essendo l'elettrone secondario sensibile all'orientazione cristallografica, le immagini così ottenute permettono una valutazione anche quantitativa delle corrispondenti interazioni. Gli elettroni secondari (SE) hanno un'energia compresa tra 0 e 50 eV e sono emessi da spessori superficiali del campione (~10nm).
- le immagini fornite dagli elettroni retrodiffusi (BEI) sono ottenute raccogliendo gli elettroni che fuoriescono dal campione con una energia che va da circa 50 eV a quella d'incidenza. Questi elettroni sono portatori di segnali principalmente compositivi e morfologici (topografici) e provengono da profondità massime di alcuni μm . Poiché il numero di elettroni rilevanti è funzione dell'angolo di incidenza e della posizione relativa del rivelatore, si possono distinguere principalmente i tre tipi di immagine seguenti. Immagini da elettroni riflessi ad alto angolo, che fornisce informazioni circa la composizione degli strati interni e della topografia superficiale. Immagini da elettroni

riflessi a basso angolo che mostra dettagli topografici superficiali e migliore risoluzione. Immagini a bassa perdita di energia che mostra una risoluzione particolarmente elevate ed un elevatissimo rapporto segnale/disturbo.

La qualità di un'immagine ottenuta al SEM viene normalmente definita da un certo numero di elementi caratteristici quali la profondità di campo, la risoluzione, il contrasto, il rapporto segnale/rumore (SNR), la specificità del fenomeno o della caratteristica che s'intende evidenziare. Per lavorare nelle migliori condizioni di selezione, di raccolta del segnale e di evidenziazione finale di una certa caratteristica, è necessario intervenire sia sull'ottica elettronica, aggiustando i parametri d'illuminazione, sia sulla selezione del segnale specifico mediante l'impiego di opportuni rilevatori. [13]

5. Risultati

L'ingegneria tissutale si avvale di cellule viventi e di supporti innovativi.

La progettazione coinvolge l'utilizzo di tre importanti componenti: cellule, scaffold e bioreattori. I principali biomateriali utilizzati per la costruzione di scaffold sono gli idrogel, sia di origine naturale che sintetica. Tra gli idrogel di origine naturale più utilizzati, e che sono stati utilizzati in questo studio, abbiamo gli idrogel di alginato.

La struttura dell'alginato è fondamentale per la formazione di un ambiente tridimensionale poroso che possa supportare la crescita e la coltura di cellule e tessuti. Questa porosità è dovuta alla formazione di una rete tridimensionale, generata dai legami ionici.

Essa può essere controllabile, cioè regolata durante la fase di produzione per adattarsi alle esigenze specifiche dell'applicazione.

In base al tipo di applicazione è possibile funzionalizzarli aggiungendo molecole bioattive, fattori di crescita, come nel nostro caso con l'utilizzo dell'estratto di fragole, o altre sostanze che influenzano il comportamento cellulare e la rigenerazione tissutale.

In generale la struttura è progettata per fornire un ambiente poroso tridimensionale che possa supportare la colonizzazione cellulare, la crescita e la differenziazione delle cellule.

L'agarosio, come l'alginato, viene comunemente utilizzato per la creazione di scaffold.

La sua struttura è fondamentale per la creazione di impalcature che supportino la crescita e la coltura delle cellule. In generale sono realizzati per sfruttare le sue capacità di formare gel termoreversibile con una struttura tridimensionale porosa.

L'agarosio forma facilmente gel. Questa capacità, infatti, lo rende un materiale utile per la creazione di scaffold. Come nel caso dell'alginato, anche l'agarosio, la concentrazione e le condizioni di gelificazione possono essere modificate per controllare la porosità e la densità della struttura tridimensionale.

Una particolarità degli scaffold di agarosio, è che hanno una stabilità termica a temperatura ambiente e possono sopportare temperature più elevate rispetto ad altri materiali utilizzati in biomedica, il che può essere un vantaggio per particolari applicazioni.

In generale, entrambe le sostanze, hanno differenze strutturali significative che influenzano le loro proprietà e le loro applicazioni.

In questo studio sono stati realizzati quattro scaffold.

I primi due scaffold sono stati realizzati interamente con idrogel, uno contenente l'idrogel di alginato, l'altro con solo l'agarosio.

Questi sono stati realizzati per poter studiare ed osservare le differenze strutturali dei singoli, attraverso l'uso del microscopio elettronico a scansione (SEM), in modo tale da poterli distinguere con chiarezza nel momento in cui siamo andati ad effettuare lo studio degli scaffold che contengono entrambe le sostanze.

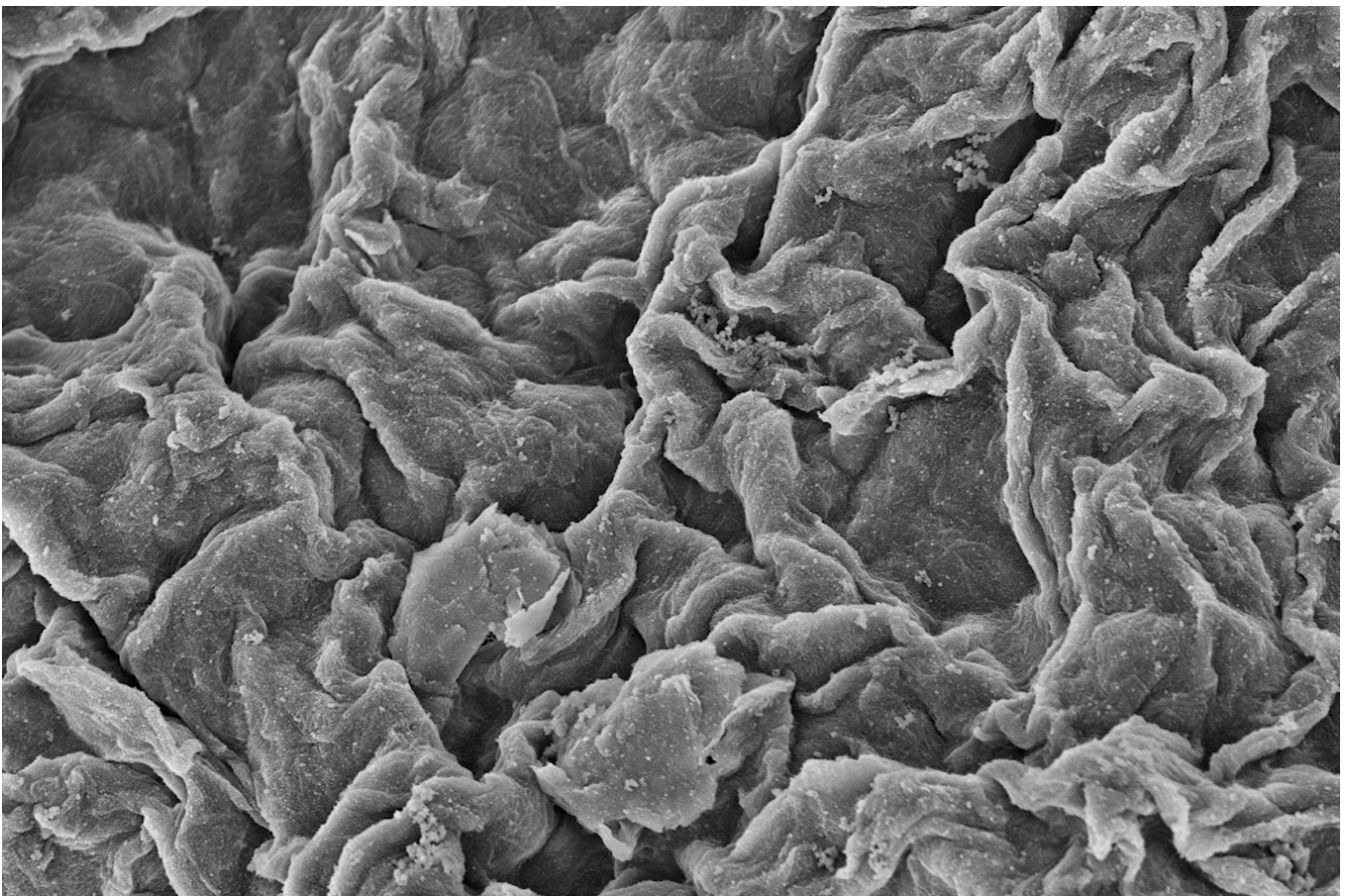


Fig. 10 scaffold con alginato

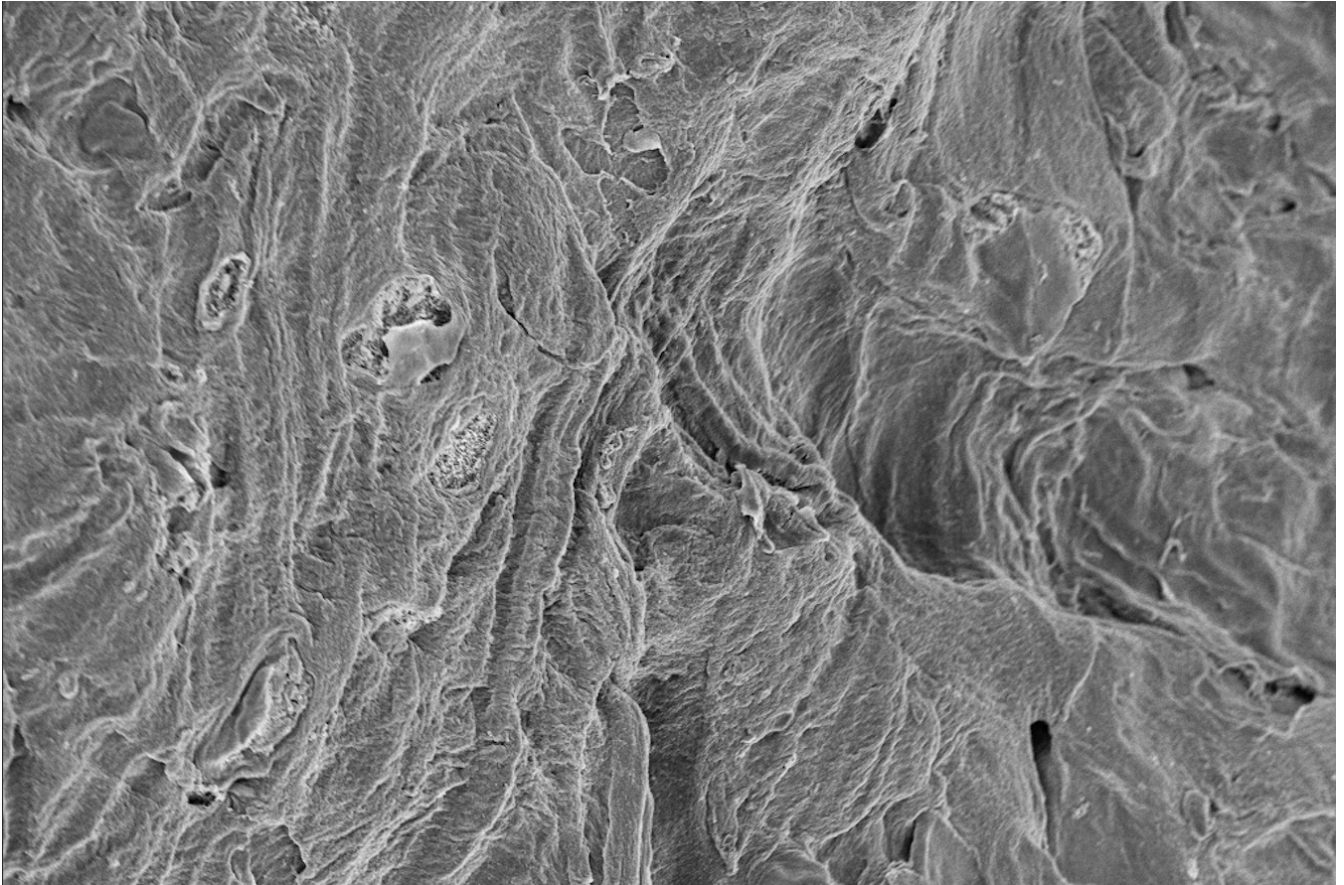


Fig. 11 struttura agarosio

Esempi delle strutture dei due scaffold le possiamo osservare nelle due immagini ottenute al SEM sopra riportate, fig. 10 e 11.

La fig. 10 ci mostra la struttura dello scaffold contenente solo alginato; la fig. 11, invece, ci mostra la struttura dello scaffold con solo agarosio.

Dall'analisi delle due immagini, che sono state ottenute, possiamo evincere che tra le due sostanze c'è una differenza strutturale.

Gli scaffold di alginato, fig. 10, hanno una struttura gelatinosa/semigelatinosa; invece, gli scaffold di agarosio, fig.11, hanno una struttura più rigida.

Per poter realizzare gli altri due scaffold, contenenti entrambe le sostanze, alginato, agarose e cellule, sono stati effettuati degli step come mostrati nella fig. 12.

Lo stesso processo è stato utilizzato per la realizzazione i due scaffold iniziali, contenuti una sola sostanza.

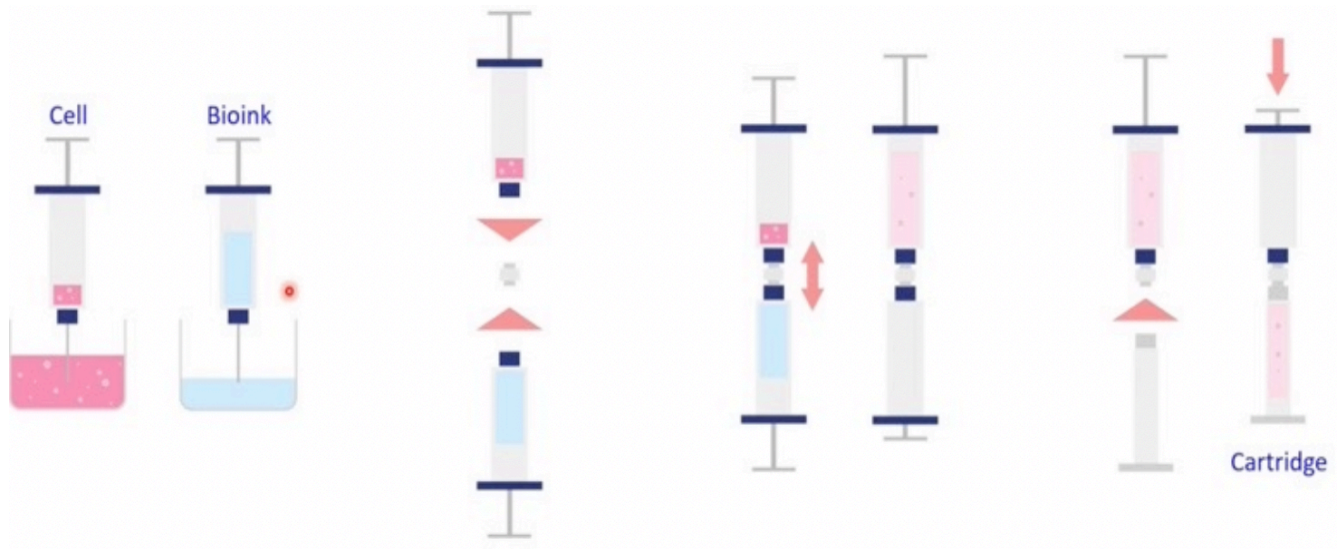


Fig. 12 rappresentazione dei passaggi per la formazione della cartuccia

Il primo step consiste nel prelevare con due siringhe una quantità di cellule e bioink.

Il secondo step si focalizza sul collegamento delle due siringhe, che ci porta al terzo step che riguarda la miscelazione delle due parti.

Come ultimo step abbiamo la realizzazione della cartuccia che in seguito verrà inserire nella stampante che formerà lo scaffold.

Una volta aver realizzato i due campioni, sono stati lasciati a riposo per circa 15 giorni.

Al termine di questi uno dei due campioni è stato trattato, con un estratto di fragole, che lo si è lasciato agire per 48h. Una volta giunti al termine di queste 48h, i campioni sono stati preparati per poter procedere allo studio.

Entrambi i campioni hanno subito un processo di fissazione, per poter conservare al meglio la struttura, che immobilizza le componenti cellulari per poi poter essere osservate.

In seguito sono stati sottoposti ad ulteriori trattamenti, per rendere la visualizzazione al microscopio ottimale. Quest'ultimo trattamento riguarda la doratura la quale permette un miglioramento del contrasto, quindi più visibile e facile da analizzare, una riduzione delle

cariche elettriche, in quanto l'accumulo di cariche elettriche potrebbero causare distorsioni o sfocature delle immagini, ed in generale protezione del campione.

In seguito, facendo una prima analisi, sul primo campione, attraverso l'uso del (SEM) la prima differenza che si nota è nella struttura. Come possiamo notare dalla fig. 13, la struttura dell'arginato è filamentosa, invece, quella delle cellule tumorali è una struttura a grappolo.

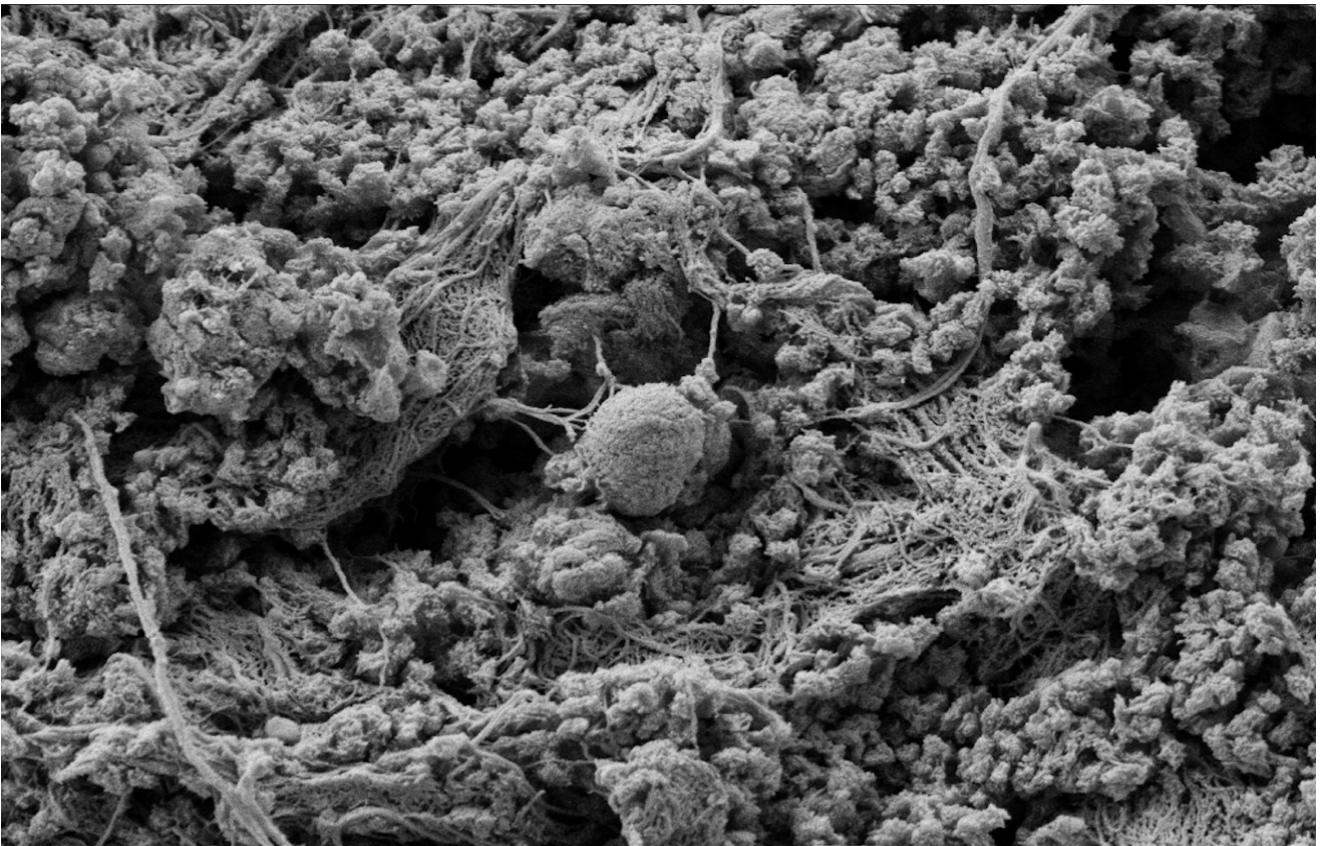


Fig. 13 immagine al SEM di cellule tumorali non trattate

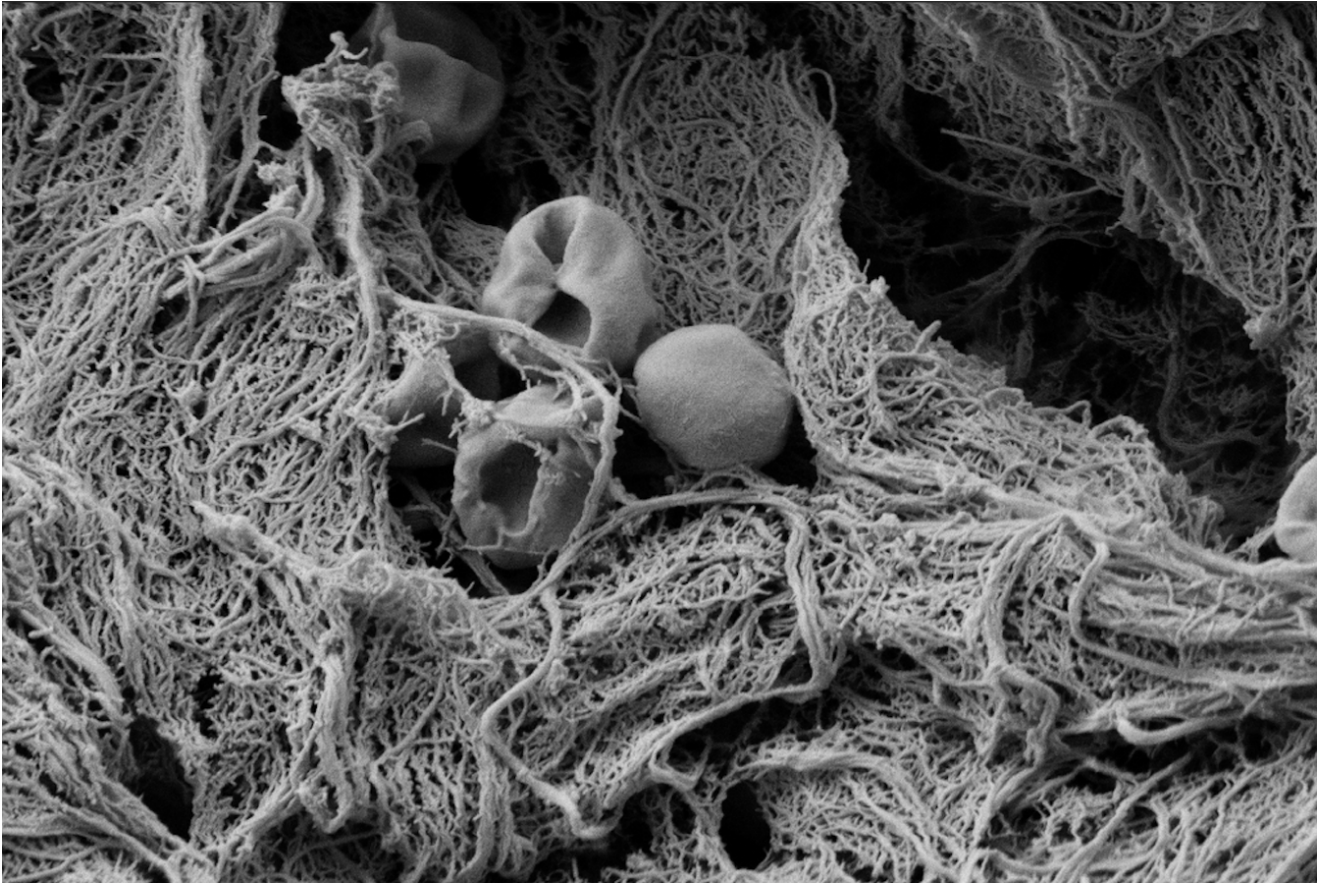


Fig. 14 immagine al SEM di cellule tumorali trattate con estratto di fragole

Andando più nello specifico, e mettendo a confronto i due campioni, fig. 13 e fig. 14, si notano delle differenze.

Dal campione non trattato si può notare che, come detto precedentemente, le cellule sono agglomerate tra loro, quasi a formare dei grappoli, a differenza del campione trattato che a causa dell'estratto di fragola, per la sua citotossicità, ha causato la morte delle cellule, detta apoptosi, che si sono unite tra loro e hanno dato forma a singole cellule.

Questo confronto ci porta a capire che l'estratto di fragole potrebbe essere un ottimo alleato per debellare il tumore, in quanto porta alla morte delle cellule.

Successivamente, altri campioni trattati per un periodo più lungo di 48h, sono stati analizzati per conoscere gli effetti che avrebbe generato.

Da queste ulteriori analisi si è visto come, maggiore è il periodo in cui l'estratto di fragole agisce, maggiore sarà la reazione di esso sulle cellule tumorali e di conseguenza la loro morte superiore.

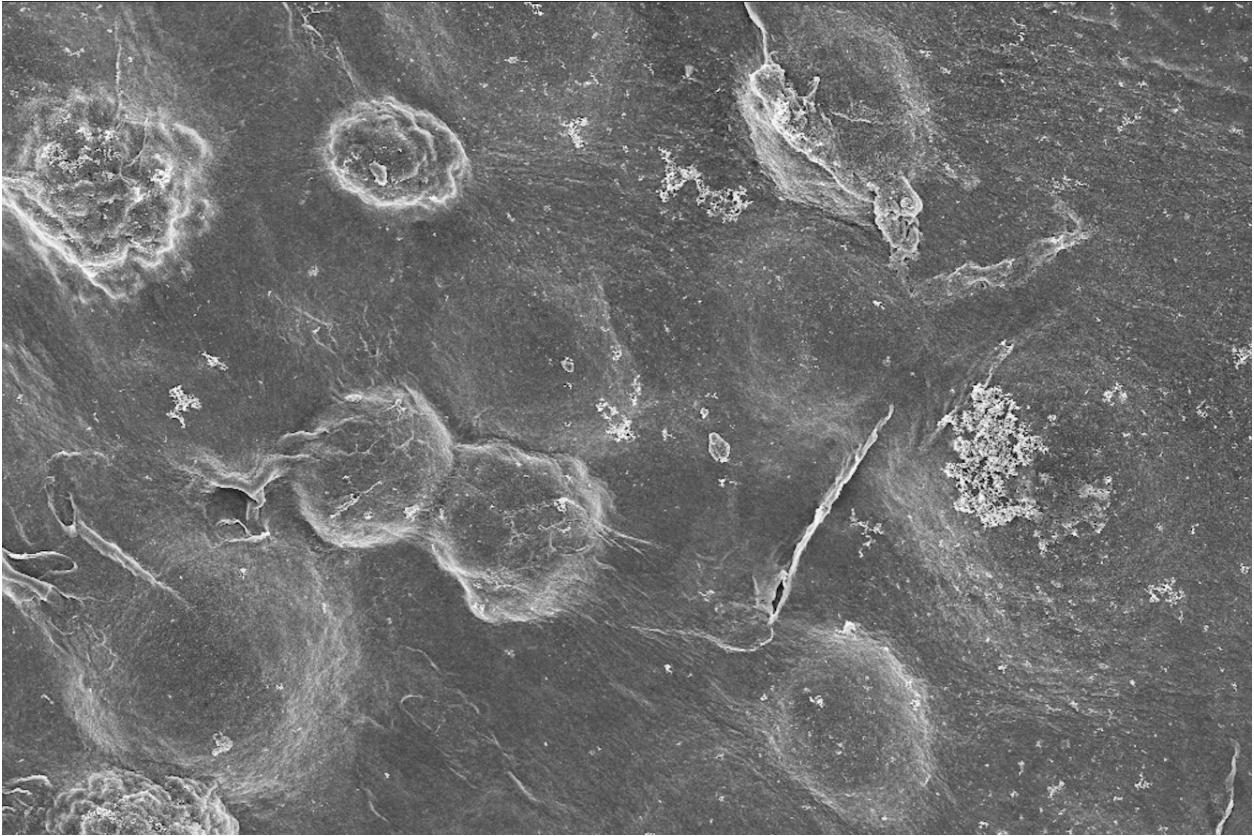


Fig. 15 immagine ottenuta al SEM dopo 72h



Fig. 16 immagine ottenuta al SEM dopo 1W

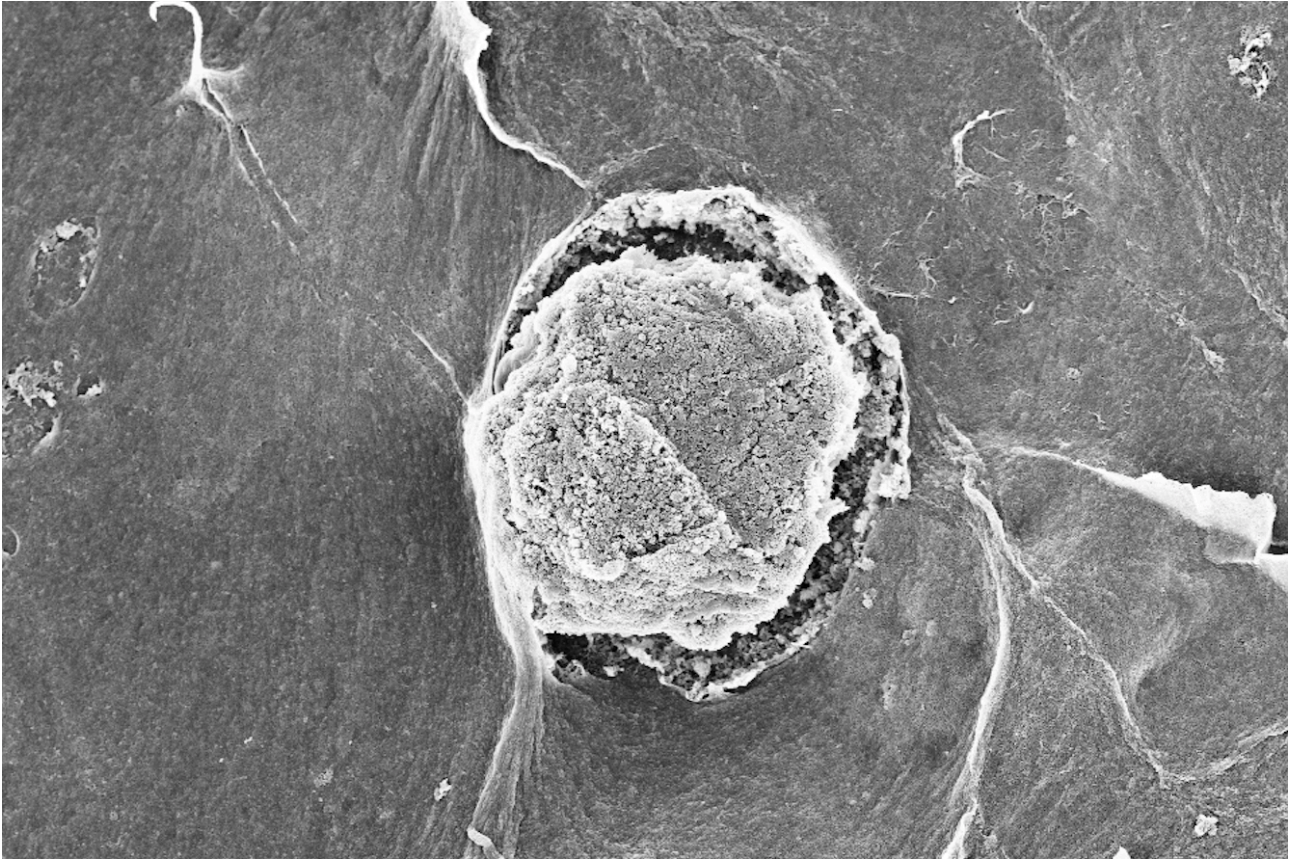


Fig. 17 immagine ottenuta al SEM dopo 10D

Bibliografia

- [1] Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress, and challenges
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22432625/>
- [2] 3D Cell Culture Systems: Tumor Application, Advantages, and Disadvantages
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8618305/>
- [3] 3D bioprinting for engineering complex tissues
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26724184/>
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0734975015300665>
- [4] S. Adamo, M. De Felici, A. Dolai, A. Filippini, M. Grano, A. Musarò, C. Nervi, G. Papaccio, A. Palustri, E. Ziparo *Istologia di Monesi*. Piccin Nuova Libreria. 2018
- [5] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter *Biologia molecolare delle cellule*. Quarta edizione. Zanichelli
- [6] Methods for assessing programmed cell death
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8975340/>
- [7] Apoptosis: a review of programmed cell death
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17562483/>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2117903/#S13title>
- [8] S. Adamo, M. De Felici, A. Dolai, A. Filippini, M. Grano, A. Musarò, C. Nervi, G. Papaccio, A. Palustri, E. Ziparo *Istologia di Monesi*. Piccin Nuova Libreria. 2018
- [9] Delly, J., *Light Microscopy*. Encyclopedia of Materials Characterization: Surfaces, Interfaces, Thin Films, ed. Brundle, R. and C. Evans. 1992, Greenwich: Manning Publication Company.
- [10] Grandi strumentazioni e Core Facilities (FAST), Analisi al SEM
<https://corefacilities.iss.it/dw/doku.php>
- [11] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter *Biologia molecolare delle cellule*. Quarta edizione. Zanichelli
- [12] S. Amelinckx, Dirk Van Dyck, J. Van Landuyt, Gustaaf Van Tendeloo, *Handbook of Microscopy Applications in Materials Science, Solid-State Physics, and Chemistry*, Wiley, (2008)
- [13] A. Armigliato, U. Valdrè. *Microscopia elettronica a scansione e macroanalisi parte I*

Ringraziamenti

Per prima voglio ringraziare la Prof.ssa Alida Mazzoli per avermi dato la possibilità di svolgere questo progetto di tesi con lei e avermi dato l'opportunità di scoprire il mondo della microscopia.

Inoltre ringrazio la Prof.ssa Francesca Luzi, per il suo aiuto durante questo percorso, la Prof.ssa Pasquapina Ciarmela per avermi fornito il materiale da poter analizzare.

Vorrei ringraziare i miei genitori, anche se con un semplice grazie non potrò ringraziarli abbastanza, per tutto quello che hanno fatto per me. Grazie per avermi supportato in ogni mia scelta, ma soprattutto supportato durante i miei pianti isterici pre o post esame. Grazie ai vostri insegnamenti sono diventata la persona che sono oggi, di cui ne vado molto fiera, e spero che lo siate pure voi.

Ringrazio Greta che, nonostante i 1076,4 km di distanza, mi è sempre stata a due passi ed è stata il mio salvagente tascabile quando ne avevo bisogno. Sei sempre stata lì, pronta a supportarmi, anche a distanza, attraverso le conversazioni di ore e ore al cellulare.

Le tue parole mi hanno dato forza e coraggio quando ne avevo bisogno.

Sono profondamente grata per la tua presenza nella mia vita. Non importa quanto lontani siamo fisicamente, il nostro legame e la nostra amicizia rimangono saldi.

Ringrazio i miei amici d'infanzia, che sono al mio fianco da ben 16 anni.

Ivan, in primis, per essere stato il mio medico portatile che si è dovuto sorbire 10000 chiamate mentre stavo male; Andrea per avermi insegnato ad essere più serena ed affrontare le cose con tranquillità (anche se lui non sa di essere un'ispirazione per me).

In generale ringrazio entrambi per essere stati sempre pronti ad ascoltarmi e darmi consigli nel momento del bisogno, e per avermi fatto ridere quando ne avevo bisogno.

Ringrazio i Cossi, che sono stati la mia seconda famiglia e mi hanno considerato come la loro terza figlia. Sono sempre stati al mio fianco e presenti in tutto il mio percorso di vittorie e sconfitte. In particolare ringrazio le loro figlie stupende, che sono state le sorelle che non ho

mai avuto. Nina, che dal mio primo giorno di vita è stata il mio spirito guida, Alessiù per avermi spronata in tutto.

Ringrazio il gruppo MUAH, con il quale ho passato questo percorso della mia vita.

Avete reso questi tre anni un po' meno ripidi grazie ai momenti di svago.

Sono fiera delle persone che siete e spero riusciate a realizzare i vostri sogni e che rimarrete le persone che ho conosciuto.

Ma un ringraziamento speciale va a Guia, per avermi sopportato in tutte le mie avventure in ospedale e in pronto soccorso. Senza di lei, possibilmente, non sarei ancora in vita.