



Corso Luigi Einaudi, 55 - Torino

Appunti universitari

Tesi di laurea

Cartoleria e cancelleria

Stampa file e fotocopie

Print on demand

Rilegature

NUMERO: 668

DATA: 07/10/2013

A P P U N T I

STUDENTE: Mondino

MATERIA: Bioingegneria Cellulare

Prof. Massai

Il presente lavoro nasce dall'impegno dell'autore ed è distribuito in accordo con il Centro Appunti.

Tutti i diritti sono riservati. È vietata qualsiasi riproduzione, copia totale o parziale, dei contenuti inseriti nel presente volume, ivi inclusa la memorizzazione, rielaborazione, diffusione o distribuzione dei contenuti stessi mediante qualunque supporto magnetico o cartaceo, piattaforma tecnologica o rete telematica, senza previa autorizzazione scritta dell'autore.

**ATTENZIONE: QUESTI APPUNTI SONO FATTI DA STUDENTIE NON SONO STATI VISIONATI DAL DOCENTE.
IL NOME DEL PROFESSORE, SERVE SOLO PER IDENTIFICARE IL CORSO.**

BIOING. CELLULARE e TESSUTALE

06/03/2013

(CORSO A SCELTA)

- I tessuti sono composti da **CELLULE** e **MATRICE EXTRACELULARE (ECM)**. Gli organi sono composti da un insieme di tessuti. Le dimensioni che vengono toccate comprendono 10 ordini di grandezza.
- Oggetti in movimento di dimensioni nanometriche sono caratterizzati da numeri di Reynolds molto bassi, cioè le forze viscoso sono molto maggiori rispetto a quelle inerziali.

$$Re = \frac{F_i}{F_v} \sim 10^{-3}$$

Esempio di macchina alla nanoscala = CHINESINA, proteina motore che utilizza energia per muovere una vescicola agganciandosi a un microtubolo.

Medicina rigenerativa:

- Dopo l'infarto una parte del tessuto cardiaco si necrotizza, rimane cioè rigida \Rightarrow il resto della parete del miocardio fa cosa per la parte non fe più \Rightarrow squilibrio della distribuzione delle forze. Il cuore cerca di limitare questo squilibrio con successivo ispessimento della parete.
- I cardiomiociti non fanno una grande capacità rigenerativa
- Generazione di un tessuto \rightarrow in vitro (EX NAO)
- Rigenerazione \rightarrow in vivo (stimolo il tessuto a rigenerarsi)

Le cellule staminali hanno la potenzialità di differenziarsi in un tot di tipi di cellule. \rightarrow si replicano in maniera incontrollata (come le cellule tumorali). Il problema è che è necessario fare un certo numero di trial diversi.

SCAFFALI = strutture progettate per essere colonizzate dalle cellule. Bisogna fornire i SEGNAI appropriati affinché avvenga la rigenerazione.

08/03/2013

- Nel 1950 Miller ha fatto un esperimento con lo scopo di studiare come la radiazione luminosa potesse aver influenzato l'atmosfera terrestre primordiale (brodo primordiale).
PROMETABOLISMO: complesse reazioni chimiche \rightarrow classi + importanti delle molecole biologiche delle cellule viventi.
Costituenti fondamentali: proteine, acidi nucleici, carboidrati e lipidi.
 I possibili progenitori potevano essere proteine o acidi nucleici. Le proteine possono essere fibrose o globulari (emoglobine), le prime forniscono un supporto mentre le seconde hanno diverse funzioni. \sim circa 10^{-9} m di grandezza (alcuni nanometri).
- **RNA**: è una molecola molto antica e versatile, si pensava prima che fosse in grado di autoreplicarsi e di dare origine alle sintesi delle proteine, senza la presenza del DNA.

Casuale \rightarrow DARWIN

Graduale e continuo che si trasferisce a tutti \rightarrow LAMARCK

- Il legame peptidico è un legame **COVALENTE** che unisce gli

Le aggregazioni delle proteine possono provocare malattie quali l'Alzheimer o il Parkinson.

Quando si parla di amminocidi si parla di ZWITTERIONI perché c'è la contemporanea presenza di carica + e -.

11/03/2013

I 20 amminocidi si classificano principalmente in 6 tipologie, a seconda del gruppo R:

- alifatica
 - contenente idrossile o zolfo (CISTEINA)
 - aromatica
 - basica
 - acido o la sua ammido
 - acido
- } ha di catena laterale

- I ponti disolfuro aiutano a stabilizzare la struttura terziaria → si tratta di un legame semi covalente.
- Le catene aromatiche, generalmente, producono ingombro sterico.

Reazione di condensazione → si forma il legame peptidico con rilascio di una molecola di H₂O.

Il legame covalente è rigido e planare.

Si originano degli angoli di torsione intorno al C₂, sono importanti perché dipendono dalla sequenza amminocidica che si va a formare.

svolt. disorganizz. che fluttua x effetto dell'agit. termica

Struttura secondaria: - α -elica
- β -foglietto

Le parti rimanenti sono caratterizzati da COILS e TURNS (COILS un po' + organizzati)

Struttura terziaria: viene occupato meno spazio, nonostante ci siano fino a 300-400 aa.

α -elice e foglietti- β sono caratterizzati da una struttura molto rigida.

I COILS sono forme poco strutturate che muovendosi possono legarsi ad altre forme.

Un esempio è il microtubulo → uno dei principali target delle malattie autoimmuni.
Ci sono forme che bloccano la mobilità dei LOOP, bloccando quindi l'interazione con le proteine nuove.

Ad una distanza di 954 nm ci sono ancora delle buone interazioni di Van der Waals ⇒ le 2 parti dell' α -elice ad un passo di 956 nm interagiscono ancora tra loro.

→ Stabilizzazione da parte dei legami H!

I foglietti β sono sostanzialmente planari: 2 filamenti di aa si affiancano in maniera //.

Anch'essi sono stabilizzati da legami H.

In acqua affondano abbastanza velocemente, cioè si rilascia il ripiegamento.

Esempio: β -amiloidi (Alzheimer)

- La struttura // è più stabile rispetto a quella antiparallela, per come sono disposti i legami H.

I LOOPS possono essere anche di 30-40 aa.

Esistono diversi tipi di analisi, tra cui la cristallografia a raggi X che permette di visualizzare le posizioni degli atomi.

I CARBOIDRATI:

- Sono generalmente aldeidi o chetoni.
- Gli disaccaridi/polisaccaridi si formano per unione di 2 o più monosaccaridi (legami α -glicosidici).

Oligosaccaridi

\swarrow \searrow
 glicoproteine glicolipidi

funzione di riconoscimento, sulla superficie delle cellule

GAG = glicosaminoglicani \rightarrow collegano fibrille di collagene nei tendini. Le fibrille di collagene non sono lunghe come il tendine.

Proteoglicani = proteine legate ai GAG

CHITOSANO è una particolare molecola contenuta nei gusci che si usa per scaffold biomedici (sono molto biocompatibili).
 Anche l'**AGAROSIO** viene utilizzato come scaffold e per analisi del DNA (separazione elettroforica) \rightarrow gel di AGAROSIO

LA CELLULA:

13/03/2013

Le cellule eucariotiche un insieme di sottosistemi organizzati chiamati organelli.

Le membrane si trovano sia sulla superficie esterna sia come superficie esterna degli organelli (membrane = tutto ciò che racchiude e crea compartimenti).

Solo il CITOSCHELETRO è contenuto all'interno della cellula ma non ha una membrana!

La membrana è fondamentale per la vitalità della cellula \rightarrow danneggiando la membrana è possibile provocare la morte cellulare.

I costituenti principali sono:

- 50% lipidi
- 50% proteine

Ci sono molti più lipidi ma le proteine pesano di più.

I fosfolipidi sono molecole AMFIPATICHE o AMFIFILICHE (compartimento idrofobico e idrofilico).

Le teste si dispongono a contatto con l'acqua, mentre le code creano una zona idrofobica dove non c'è acqua.

La membrana ha uno spessore di circa 6nm (un fosfolipide = 3nm), ha inoltre un carattere fluido (non è rigida e statica) perché i fosfolipidi sono in continuo movimento.

Più è bassa T più è rigida, la lunghezza delle code idrofobiche e il grado di insaturazione anche determinano la fluidità della membrana.



Se ci fosse solo il legame singolo, la struttura sarebbe molto più ordinata.

Il colesterolo irrigidisce la prima parte delle code e stabilizza la membrana.

Mettendoli in mezzo diminuisce la permeabilità della membrana.



→ **microtubuli**: Sono strutture cilindriche cave, anche loro polari. Le subunità sono α -tubulina e β -tubulina. Sono strutture dinamiche che possono crescere e disassemblarsi da entrambe le estremità, lentamente. Possono crescere e disgregarsi rapidamente (si chiama catastrofe). La vita media di un microtubolo è intorno ai 10 minuti. I microtubuli sono associati alle proteine motore. Sono associati a flagelli e ciglia (svolgono un ruolo chiave per quanto riguarda flagelli e ciglia). Sono fondamentali nel processo di mitosi.

→ **filamenti intermedi**: sono costituiti da diversi tipi di proteine fibrose (come subunità). Si trovano soprattutto in cellule sottoposte a sforzi meccanici. Si differenziano dagli altri perché sono molto stabili e insolubili, non si disgregano e riaggregano in continuazione. Sopportano forze di strappamento molto maggiori, è causa della loro struttura. → conferiscono maggiore resistenza alle cellule. Cosa nel riassunto pag. 25 da sapere!!!

I mitocondri: si trovano all'interno della cellula e producono molecole che contengono energia e che saranno utilizzate per svolgere funzioni all'interno della cellula. Hanno una doppia membrana, quella interna è molto ripiegata perché aumenta la superficie. Hanno un loro DNA, perché erano dei batteri che sono stati inglobati all'interno della cellula; sono quindi semi-autonomi.

Il nucleo: ha una sua membrana, all'interno c'è il nucleolo e fuori c'è il reticolo endoplasmatico. ER ruvido: ha dei ribosomi attaccati, in generale l'ER sintetizza proteine (in particolare quello liscio metabolizza carboidrati e steroli). L'apparato di Golgi prende le proteine, subiscono una serie di impaccamenti (folding) prima di essere pronte "all'uso".

I lisosomi: sono vescicole che contengono degli enzimi che permettono l'avvenimento di determinati processi.

15/03/2013

È importante l'apporto di energia a livello cellulare per far sì che alcuni processi avvengano.

In primo luogo il movimento, poi la sintesi dei composti (proteine) e infine per il trasporto di ioni e molecole sia internamente alla cellula che attraverso.

L'energia proviene dal cibo che mangiamo, i mitocondri sono in grado di trasformare ciò che arriva dall'esterno in energia. L'ATP è caratterizzato da un legame molto forte che trattiene l'energia → l'ATP è il trasportatore di energia.

LA MATRICE EXTRACELLULARE: Immagino una spugna biologica carica di acqua.

I tessuti sono costituiti da tante cellule adese alla matrice extracellulare.

Non tutte le cellule necessitano di una matrice cellulare, per esempio i leucociti!

Le cellule aderiscono sia al substrato che alle cellule vicine (creano contatti intercellulari).

La matrice extracellulare è un composto di biopolimeri e macro-molecole altamente specializzate. I suoi compiti:

- fornisce supporto e sostegno alle cellule

18/03/2013

ADESIONE CELLULARE:

Le cellule aderiscono al substrato e tra di loro.

L'integrina è una proteina con un filamento α e uno β , è una proteina di membrana quindi collega ciò che sta dentro la cellula (microfilamenti di actina, filamenti intermedi) e ciò che sta al di fuori.

Le cellule all'interno di un vaso sanguigno sono sottoposte a sforzo di taglio e sforzi arcocentrifugali quindi è fondamentale l'adesione tra di esse e tra esse e il substrato.

Le cellule devono anche essere in grado di staccarsi: per esempio quando un tessuto viene danneggiato ci sono delle molecole segnale che emanano dal danno \Rightarrow maggior apporto di nutrienti e cellule (ANGIOGENESI: nascita dei nuovi vasi sanguigni che irradiano la zona danneggiata) \rightarrow le cellule endoteliali iniziano a migrare ed a proliferare per generare il nuovo vaso che porta nutrienti alla zona danneggiata.

Le cellule sentono l'ambiente biomeccanico attraverso variazioni del substrato.

Adesione cellula-cellula \rightarrow creazione tessuto 3D

Adesione cellula-substrato \rightarrow organizzazione spaziale e orientamento

Adesione cellula-cellula:

- OMOTIPICA: quando si tratta di cellule dello stesso tipo (Caderine)
- ETEROTIPICA: quando si tratta di cellule diverse (reazioni)

Adesione cellula-substrato: è vitale per molti processi biologici.

I recettori sono proteine, possono essere transmembrana o intracellulari.

RECEPTORI DI ADESIONE (CAM): sono proteine transmembrana e consentono alla cellula di formare legami.

Sono composte da 3 domini:

- zona CITOPLOSMATICA
- zona TRANSMEMBRANALE
- zona EXTRACELLULARE

Ligandi = ciò con cui si lega il recettore

- Quando si legano ai ligandi tendono a formare i cluster: nel sito di adesione si forma un cluster di recettori (non c'è un solo recettore che fa l'adesione).

Le adesioni cellulari non sono mai dovute ad un solo legame (come il velcro) \rightarrow la forza del legame di un solo gancio del velcro è bassissima, tanti ganci consentono di tenere le cose adese ma nello stesso tempo è possibile staccarle con facilità. Se ci fosse un solo legame fortissimo, servirebbe moltissima energia per staccare le cellule.

- I recettori transmembrana sono spesso legati a componenti del citoscheletro (filamenti di actina o microfilamenti).
- I cluster di recettori sono collegati a proteine regolatrici che mediano il legame.

CADERINE: è un recettore di adesione cellula-cellula.

È fondamentale la presenza di ioni Ca^{2+} affinché esse possano comunicare.

Hanno un piccolo dominio intracellulare mentre un grande dominio extracellulare \rightarrow tipo di legami omotipici.

Le caderine sono proteine regolatorie che fanno da tramite! Le caderine classiche sono caratterizzate dal fatto che il loro

Da cui ricaviamo $C_{eq} = C_{eq} = \frac{K_r L_0 / K_D}{1 + L_0 / K_D}$ → n° di complessi recettore-ligando

$$\frac{C_{eq}}{R_r} = F_{eq} = \frac{L_0 / K_D}{1 + L_0 / K_D}$$

Se $L_0 = K_D$ → conc. iniziale di ligandi → $F_{eq} = 1/2$ ⇒ la frazione di recettori complessati è pari al 50%.

Se K_D è elevato, è necessaria un'elevata concentrazione di ligandi. → è inversamente proporzionale all'affinità di legame

$$K_D = \frac{K_r}{K_f}$$

Questo modello non è utilizzabile "in vivo", ma solo "in vitro"!!
In vivo infatti vi sono continue variazioni (sia recettori che ligandi variando), → abbiamo fatto un modello semplificato

ADESIONE FOCALE:

Sono le zone in cui avviene l'adesione tra l'integrina e le proteine della matrice extracellulare.

Quando le cellule non sono adese sono sferiche, in seguito ad adesione si spappellano.

20/03/2013

Quando la cellula aderisce cambia la sua forma perché il citoscheletro si muove "tratto" dai legami che si formano: scambio di forze tra substrato e cellula.


L'adesione è fondamentale per la migrazione cellulare.

L'adesione è fondamentale nelle fasi di differenziamento → non differenzia mentre è staccata dal substrato o mentre migra.

È anche fondamentale durante la secrezione delle proteine.

La migrazione è invece fondamentale nel processo di proliferazione.

MIGRAZIONE CELLULARE: → domande d'esame (10 righe)

schema cellula adesa: 

Se la cellula non espone integrine non si verifica l'adesione focale quindi l'integrina fa un ruolo fondamentale! ⇒ la cellula rimane di forma sferica (perché non sta esponendo le proteine di membrana).
Si tenta di sviluppare dei farmaci che non consentano alle cellule tumorali di aderire.

La migrazione cellulare è un processo fondamentale all'interno dell'organo stesso.

- Una cellula tumorale si riproduce in maniera incontrollata, toglie quindi spazio alle altre cellule. Poi le cellule tumorali possono subire metastasi, che consentono ad alcune di esse di migrare.

Grazie al flusso sanguigno possono quindi andare ad aderire e proliferare in qualsiasi altro organo.

Solitamente non si muore mai a causa del tumore primario, ciò che porta alla morte del paziente sono le metastasi → focoli di cellule tumorali in tutto il corpo.

⇒ la migrazione è anche alla base delle metastasi peggiori.

- Un neutrofilo, grazie alla migrazione, può fagocitare i batteri (i recettori "sentano" cioè che il batterio produce).
- A voi interessa che le cellule possono migrare all'interno dello scaffold!

L'obiettivo del biomimetismo è quello di simulare cosa succede in vivo ingegnerando le cellule con un materiale biologico che riveste un tessuto artificiale.

Affinché una cellula possa migrare c'è bisogno di almeno 3 elementi fondamentali: **LEGAMI**, **RECEPTORI**, **CITOSCHELETRO**.

Il modulo di Young ha la stessa unità di misura dello sforzo σ :
 ↳ ricordo le unità di misura!!

- I materiali biologici sono in mezzo ai polimeri per quanto riguarda la classificazione secondo il modulo di Young (E).
- I biopolimeri possono essere tenuti insieme da interazioni molto basse, la densità è invece di 10 Å^3 (acqua).

$k_B = 1,38 \cdot 10^{-23}$ (costante di Boltzmann) → da ricordare!!

Resistenza allo stretching del biofilm:

$$F = \frac{\pi^2 \gamma}{f_0} \frac{\Delta L}{L}$$

f_0 è la costante di forza

$$E = (f_0/2) \frac{\Delta L^2}{L} = k_B \cdot T/2$$

$$\Delta L = \sqrt{\frac{k_B T L}{f_0}}$$

Possibile domanda:

qual è l'energia che serve a flettere un biofilm? (focus colossi)

A scale elevate f_0 una lunghezza del filamento ben definita.

$k_s = \gamma \frac{A}{l_0}$ (legge di Hooke)

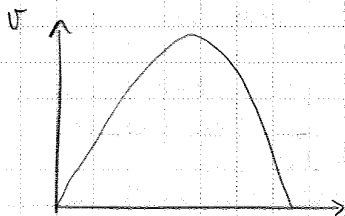
* Per i segnali chemiotattici l'andam. 26/03/2013

MECCANO SENSING e MECCANOTRASDUZIONE:

La cellula reagisce rispondendo a segnali o gradienti:

- chemiotattici (ligandi solubili)
- aptotattici (ligandi insolubili o immobilizzati) es. proteine della ECM con elevato peso molecolare

La migrazione cellulare dipende da questi gradienti!
 Pochi ligandi significa pochi segnali quindi la velocità di migrazione è bassa, quest'ultima però varia in maniera bifasica.
 Infatti esiste una sorta di saturazione, dopo la quale la relazione diventa inversamente proporzionale.



Per i segnali aptotattici:

Se ce' poca fibroectiva, le cellule aderiscono poco e se non aderiscono non possono migrare.

Se ce' una concentrazione intermedia di fibroectiva, le cellule riescono ad aderire e quindi anche a migrare.

Se ce' troppa fibroectiva, le cellule non riescono a migrare perché la concentrazione di ligandi è molto alta e le cellule aderiscono molto e hanno difficoltà a muoversi.

Tanto maggiore è l'affinità di legame ($1/k_D$) tanto più piccola può essere la concentrazione di ligando; mentre se l'affinità è scarsa è necessaria un'elevata concentrazione per far migrare le cellule.

Non solo la concentrazione di ligandi ma anche il tipo di legame influenza la velocità di migrazione.

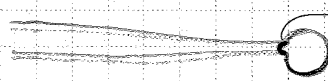
Inoltre la cellula stabilisce adesioni anche con le cellule vicine: se le cellule sono molto adese fra di loro riusciranno meno a migrare.

Esiste una sorta di COMPETIZIONE DINAMICA fra adesione cellula-cellula e adesione cellula-substrato.

La maggior parte delle cellule sono ancoraggio-dipendenti: devono essere ancorate ad un substrato e adese fra loro. È il citoscheletro che permette alla cellula di sentire quello che

Inspirazione con micropipetta e dispositivi per stimolazione meccanica:

L'aspirazione con micropipette è stato uno dei metodi per studiare il comportamento cellulare, in particolare per cellule nuove applicate una pressione (cellule non adesive).



Le cellule nuove aspirate in parte

La parte colorata si chiama PROTRUSIONE!

La micropipetta è un tubo rigido svasato con raggio più piccolo del diametro della cellula (qualche micrometro).

Si può utilizzare la bocca o un reservoir per applicare la pressione.

R_{pip} = raggio pipetta dove una c'è affusolamento ma $R = cost.$

L_{pro} = lunghezza protrusione.

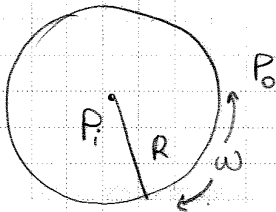
La protrusione aumenta sempre più fino a che la cellula entra

→ **MODUS A GUTTA** DI LIQUIDO: la maggior parte delle cellule si comporta come la goccia di un liquido.

Si suppone che l'interno della cellula sia un fluido newtoniano, che la membrana sia molto sottile con tensione superficiale costante. Si assume inoltre che non vi sia frizione tra la cellula e le pareti della micropipetta.

$n = \sigma d$

n = tensione superficiale



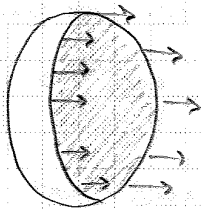
$F_p = (P_i - P_o) \pi R^2$

$F_t = n 2\pi R$

P_i = pressione interna

P_o = pressione esterna

$F_p = F_t \Rightarrow (P_i - P_o) \pi R^2 = n 2\pi R$



Uguagliando si arriva alla legge di Laplace

$P_i - P_o = \frac{2n}{R}$

Legge di Laplace per la parte della cellula che sta al di fuori della micropipetta.

$P_{cell} - P_{atm} = \frac{2n}{R_{cell}}$

Legge di Laplace per la parte della cellula che sta dentro la micropipetta

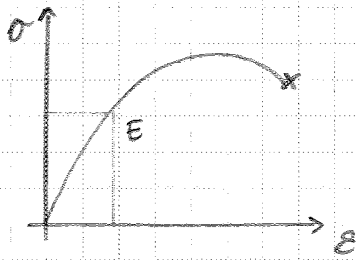
$P_{cell} - P_{pip} = \frac{2n}{R_{pip}}$

$P_{atm} - P_{pip} = \Delta P = 2n \left(\frac{1}{R_{pip}} - \frac{1}{R_{cell}} \right)$

→ mette in relazione la differenza di pressione con il raggio della cellula internamente ed esternamente.

da questa relazione possiamo calcolare la tensione superficiale n !

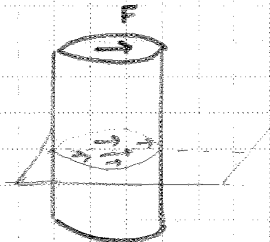
Li interessa mettere in relazione σ e ϵ :
 Supponiamo che il cilindro sia omogeneo, che il materiale abbia comportamento elastico e caratteristiche isotrope (stesso comportamento in tutte le direzioni).



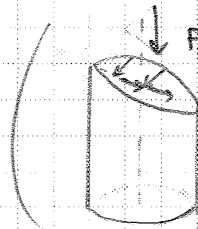
Nel primo tratto si ha un comportamento lineare, descritto da $\sigma = E \epsilon$

↓
 coeff. di proporzionalità

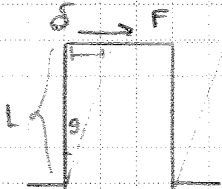
Applico ora una forza $F \parallel$ alla superficie del cilindro:



$$\tau = F/A$$



→ Ottengo sia sforzi di taglio che sforzi normali (scomposizioni di F)



- Traslazione della superficie superiore di δ
- θ rappresenta l'angolo di cui viene ridotto quello di 90° iniziale.

$$\tan \theta = \delta/L$$

Se $\delta \ll L$ allora $\tan \theta \approx \theta$

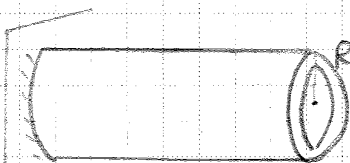
$$\Rightarrow \theta \approx \delta/L$$

Relazione fra τ e θ :

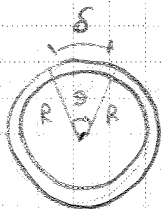
$$\tau = G \theta \quad (\tau = G \gamma)$$

Torsione:

Considero un cilindro cavo con uno spessore piccolo:
 applico un momento



È importante dire che è vincolato!
 (> k cambia il comportamento meccanico)



$$\delta = \theta R \quad (C = 2\pi R)$$

$$\gamma = \frac{\delta}{L} = \frac{\theta R}{L} \quad (\text{in termini di deformaz. di taglio})$$

$$M = \tau \cdot A \cdot R \quad (\text{Forza} \cdot \text{braccio})$$

$$\text{Definiamo l'area: } A = 2\pi R \cdot t$$

t = spessore

Se $t \ll R$
 $\rightarrow A = 2\pi R t$

$$M = \tau \cdot 2\pi R^2 \cdot t \rightarrow \text{espressione del momento in funz. dello sforzo di taglio, dell'area e dello spessore del cilindro.}$$

Considerando queste 3 relazioni:

$$M = \int_{-t/2}^{t/2} y \sigma(y) R dy = \int_{-t/2}^{t/2} E \epsilon(y) R y dy = \int_{-t/2}^{t/2} E y^2 \kappa R dy = \int_{-t/2}^{t/2} E y^2 \frac{d^2 w}{dx^2} R dy$$

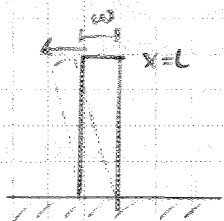
$$M = \frac{EI}{dx^2} \frac{d^2 w}{dx^2}$$

rigidezza flessionale

$$\begin{cases} \frac{d^2 w}{dx^2} = \frac{M(x)}{EI} \\ w(0) = \frac{dw(0)}{dx} = 0 \end{cases} \rightarrow w(x) = \dots$$

$M = F(x-L)$ (forza braccio $\rightarrow M = -F(L-x)$)

$$w(x) = \frac{F}{EI} \left(\frac{x^3}{6} L - \frac{x^2}{2} L \right)$$



$$w(L) = \frac{F}{EI} \left(\frac{L^3}{6} - \frac{L^3}{2} \right) = -\frac{FL^3}{3EI}$$

05/04/2013

Continuazione BIOPOLIMERI:

Possiamo prendere le distanze tra i 2 estremi del filamento:
 r_{ee} = end-to-end distance

$$\langle r_{ee}^2 \rangle = \langle [r(L) - r(0)]^2 \rangle$$

Vogliamo trovare la correlazione tra lunghezza persistente e distanze end-to-end (r_{ee}).

Le catene self-avoiding entano che i segmenti si sovrappongono. Quando si considerano i biopolimeri non sempre si ha o che fare con catene lineari: in questo caso le distanze end-to-end perde di significato.

Energie libere di Helmholtz: $H = W - T \cdot S$

\rightarrow en. interne
 \hookrightarrow entropia

Quando T aumenta il filamento tende ad aumentare la sua costante elastica! (slide 38)

08/04/2013

MICROSCOPIA E METODI DI CARATTERIZZAZIONE CELLULARE:

- Per osservare le cellule vengono utilizzati i microscopi.
- La lente è un elemento ottico che può essere convergente (foca lizza in raggio di luce) o concava (disperte in fascio di luce).
- La risoluzione è la distanza minima alle quale riusciamo a distinguere 2 punti.
- La lunghezza d'onda è la distanza picco-picco delle onde elettromagnetiche che rappresentano la luce.
- L'indice di rifrazione è la variazione di velocità della luce al variare del mezzo incontrato.
- Il numero è il segnale non voluto.
- La luce arriva dal basso!
- Le cellule sono molto sottili e trasparenti quindi si utilizza

Con una trappola ottica si è riusciti a creare un uovo con un filamento di actina.

Per mezzo della trappola ottica posso spostare gli elementi.

Differenze fra trappola ottica e micromanipolatore magnetica: Le particelle intrappolate da una trappola ottica si trovano sempre in una condizione di equilibrio.

Essa permette di utilizzare solo fasci di intensità limitata.

MICROSCOPIA A FORZA ATOMICA: (AFM)

è una tecnica completamente diversa perché entra direttamente in contatto con la superficie della cellula.

Ha una punta costituita da un cantilever (estensione flessibile) che mi permette di ricostruire la morfologia della superficie.

Più è piccola la punta e più abbiamo risoluzione.

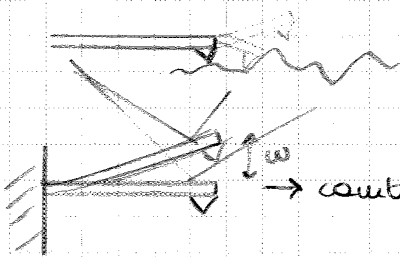
Sono per:

- ricavare informazioni sulla forma
- caratterizzare meccanicamente il materiale (E, ν)

Sotto il prisma c'è un attizzatore che trasla.

Faccio muovere il supporto dell'oggetto, così la punta può sondare diverse parti del campione.

Quando la punta incontra un avvallamento tende ad andare verso il basso, mentre quando incontra una cresta la punta si alza e subisce una deflessione.



Le deflessioni che può subire il cantilever sono dell'ordine dei nanometri praticamente impercettibili => si usa una luce riflessa.

→ cambia la direzione del fascio di luce

$$w(l) = -\frac{Fl^3}{3EI}$$

$$F = -\frac{3EI}{l^3} w$$

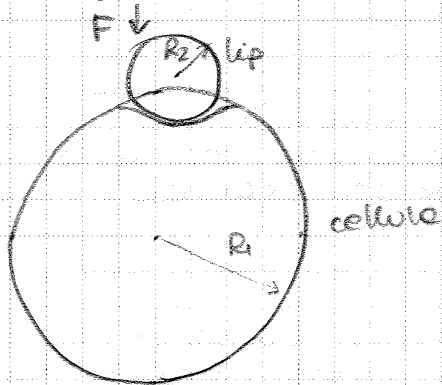
ricordo relazione fra forze e spostamento!

Può esserci un es. con 2 forze, car. mecc. e def. Finitiva a pag.

Come faccio a ricavare le proprietà meccaniche?

→ modello fra materiale e punta (MODELLO DI HERTZ)

Il modello di Hertz descrive il comportamento fra una sfera rigida e un materiale linearmente elastico.



Cellula e punta sono isotrope, il contatto è semplicemente un pto di contatto senza adesione o forze di frizione.

$$\frac{1}{E^*} = \frac{1-\nu^2}{E} + \frac{1-\nu_1^2}{E_1} \quad E^* = \text{modulo combinato}$$

$$\frac{1}{R} = \frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} = \text{curvature relative}$$

L'interazione fra punta e campione può essere ottenuta in 3 modi:

- CONTACT MODE
- NON-CONTACT MODE
- TAPPING MODE

che funzionano come in vivo.

Sono segnali biochimici e fisici fondamentali per guidare la crescita e il comportamento delle cellule.

GENERAZIONE di tessuto biologico → in vitro

RIGENERAZIONE di tessuti (organi) → in vivo

Se voglio generare un tessuto devo:

- scegliere le cellule (nella rigenerazione in vivo posso utilizzare quelle già presenti nel tessuto).
- scegliere lo scaffold (quando inietto direttamente le cellule staminali non c'è bisogno di uno scaffold).
- seminare e colonizzare le cellule nello scaffold (se lo scaffold è 3D spesso devo perforare forzatamente lo scaffold, per esempio grazie ad un bioattacco).
- cultura cellulare (devo far sì che si trasformi in un tessuto maturo: corretta temperatura, corretto pH ecc. + stimoli fisici).
- proliferazione e differenziamento cellulare (se si sono verificate le condizioni ideali).
- secrezione e maturazione (Anche le morfologie è uno stimolo x le cellule!)
- impianto
- integrazione

→ x le loro proprietà vengono usate soprattutto nella ricerca di base o applicata?

Devo scegliere un tot di popolazioni cellulari: cellule del tessuto da generare + cellule che interagiscono con l'ECM e quelle che danno origine ai vasi sanguigni → CO-COLTURE

- Cellule primarie differenziate
- Cellule di linea
- Cellule staminali

La capacità applicativa delle cellule dipende nel telomero che più piano si aggancia → le cellule e tessuto biologico si riproducono solo fisic.

→ Le prime sono quelle estratte direttamente dal tessuto prelevato → non fanno subito modifiche.

Sono caratterizzate da un determinato fenotipo stabile nel tempo (il fenotipo dei cardiomiociti è sicuramente diverso da quello degli osteoblasti).

Bisogna scegliere un sito di prelievo funzionalmente non importante.

Dopo al più 50 replicazioni le cellule dell'organismo smettono di replicarsi → capacità rigenerativa limitata. ^{diminuisce il n° di cellule x unità di indiv.}

Inoltre con l'età dell'individuo diminuisce la capacità proliferativa (i tessuti di un individuo giovane sono + ricchi di cellule).

In fine quando non si trovano all'interno dell'ambiente fisiologico possono perdere il loro fenotipo.

⇒ in generale estrarre cellule è complicato.

Il cuore non è in grado di riparare i cardiomiociti non fanno capo a cellule che si rinnovano nel tempo.

→ Le linee cellulari sono cellule che sono state rese in grado di riprodursi a spese tumorali tramite virus per modelli di studio e non come per ricerca e non per scopi terapeutici. ^{capacità rigenerativa limitata} ^{diminuisce con l'età} ^{possono perdere il loro fenotipo se non sono cellule fisiche} ^{assenza di biocompatibilità}

→ Le cellule staminali sono cellule che possono differenziarsi in tutti i tipi di cellule fino ad arrivare a cellule che si riproducono solo in un tipo. → cellule non specializzate in grado di differenziarsi in cellule specializzate. ^{17/04/2013}

- sono cellule non differenziate non specializzate → sono in grado di riprodursi illimitatamente.
- possono differenziare in cellule specializzate.

Nel 2002 si è accorti che cellule staminali messe in appropriate condizioni ambientali differenziano in un determinato tipo di cellule rispetto a quello del tessuto dove si trovano. L'utilizzo di cellule staminali di un embrione è tutt'ora argomento di dibattito perché si distrugge l'embrione, quindi la vita.

Le colture cellulari possono essere fatte in sospensione (per esempio per le cellule del sangue, che non necessitano di essere adese al substrato) → si tengono in movimento; oppure in un substrato, quando le cellule necessitano di essere adese al substrato per poter proliferare.

Vengono utilizzati contenitori usa e getta di polistirene (particolare tipo di plastica), sterili e trasparenti (per vedere al microscopio).

Il mezzo di coltura o medium è fondamentale ed ha principalmente 4 ruoli:

- mantenere l'ambiente biochimico il più possibile simile a quello nativo.
 - contenere i nutrienti
 - mantenere il pH
 - fornire un'indicazione visiva dello stato di salute delle cellule → viene inserito il rosso fenolo, un indicatore di pH che un permette di vedere qualitativamente se il pH è mantenuto ad un valore accettabile (colorazione rosa).
- Quando si ha a che fare con colture di cellule staminali bisogna ridurre il più possibile il volume perché richiedono farmaci di crescita e ormoni che costano moltissimo.

ESERCITAZIONE BIOPOLIMERI: → di esame è probabile che questo sia il caso scelto multiplo 19/04/2013

① Motoneurone che contiene un gruppo di microtubuli. La lunghezza persistente dei microtubuli vale $2 \mu m$. Calcolare l'energia necessaria per piegare un microtubulo lungo $20 \mu m$ in un arco di 90° con raggio pari a $10 \mu m$.

$$\frac{E_{bend}}{L} = \frac{K_f}{2} \cdot \frac{1}{R^2} \quad K_f = \frac{\pi}{4} \gamma r^4 \quad \gamma \rightarrow 4 \cdot 10^8 Pa$$

$$\xi_p = \frac{K_f}{k_B T} ; \quad K_f = \xi_p (k_B T) = 4,1 \cdot 10^{-27} \quad = 8,2 \cdot 10^{-26} N m^2$$

$$E_b = K_f \frac{L_c}{2R^2} = \boxed{8,2 \cdot 10^{-23} J}$$

② $L_c = 10 \mu m$

θ = angolo medio di flessione di un filamento

Calcolare $\langle \theta^2 \rangle^{1/2}$

$$\xi_p = 2 \cdot 10^3 \mu m \quad (\text{lunghezza persistente})$$

$$\langle \theta^2 \rangle^{1/2} = \sqrt{\frac{2L_c}{\xi_p}} = \sqrt{\frac{2S}{\beta K_f}} = 0,1 \quad \beta = \frac{1}{k_B T} \quad K_f = EI$$

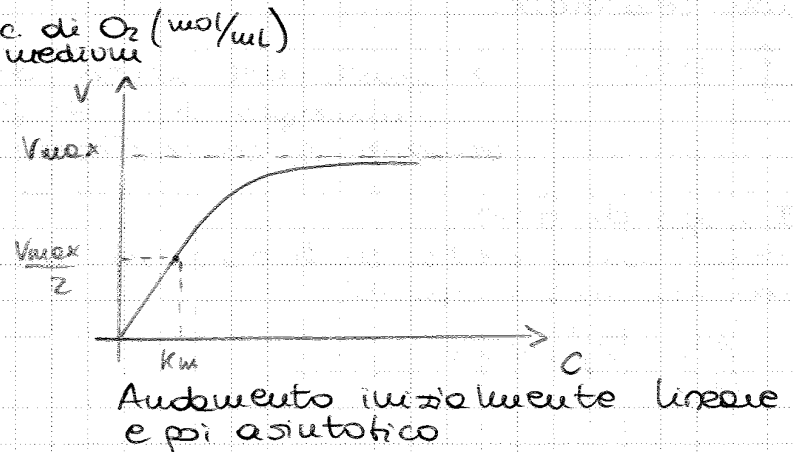
MEDICINA RIGENERATIVA: FENOMENI DI TRASPORTO E SCAMBIO 22/04/2013

È importante che il medium sia ossigenato → diffusione di soluto (ossigeno) in solvente (medium).
 L'incubatore mantiene una temperatura di circa 37°C, simile a quella in vivo; è una sorta di forno con diversi flussi.
 Un altro controllo è quello della pressione parziale di CO₂ (5%)
 L'umidità è molto alta: 95-99% → c'è un foro sul fondo

Modello per descrivere il consumo di ossigeno da parte delle cellule: (MICHAELIS-MENTEN)
 Influisce il tipo di cellule, la temperatura (a temperature basse rallenta il metabolismo ⇒ minor consumo di O₂)...
 Il modello di Michaelis-Menten semplifica il concetto rapporto consumo di O₂ alla quantità di O₂ presente nel terreno.

$$V(c) = V_{max} \cdot \frac{c}{K_m + c}$$

Consumo volumetrico max che le cellule possono avere



RICORDO:

- Per valori molto alti di concentrazione di ossigeno ($c \gg K_m$), $V(c) \sim V_{max}$ → CINETICA 0
- Per valori molto bassi di concentrazione di ossigeno ($c \ll K_m$), $V(c) \sim \frac{V_{max}}{K_m} \cdot c$ → CINETICA DI I ORDINE

È importante conoscere anche la densità della coltura cellulare

Per calcolare c (concentrazione di O₂) ci si riferisce alla legge sperimentale di Henry:

$$c = \alpha \cdot p$$

La conc. di un gas in un liquido è proporzionale alla pressione parziale del gas a contatto con il liquido, tramite il coefficiente di solubilità α .

$$\alpha_{O_2} = 1,3 \frac{\mu\text{mol}}{\text{ml}_{H_2O} \cdot \text{mmHg}}$$

il medium viene approssimato come se fosse acqua!

$$p_{O_2} = 20\% \text{ atm} = 0,2 \cdot 750 \text{ mmHg} = 150 \text{ mmHg} \quad (T = 37^\circ\text{C})$$

$$c = \alpha \cdot p = 1,3 \cdot 150 = 0,2 \mu\text{mol/ml}_{H_2O}$$

Il coefficiente di diffusione è una proprietà fisica di un soluto in un determinato solvente ad una certa temperatura.

$$D = \frac{KT}{6\pi\eta r} \rightarrow \text{è inversamente prop. alla dimensione della particella}$$

È importante conoscere la concentrazione di O_2 in funzione della profondità per sapere quanto medium inserire (la concentrazione è inversamente proporzionale all'altezza del medium → i dischi di Petri sono larghi ma non molto alti!)
 Quando si può sfruttare anche il fenomeno di convezione oltre alla diffusione, il medium viene mescolato, quindi è possibile usare anche recipienti alti → solitamente in questo caso le cellule sono in sospensione.

$$t_{rea} = \frac{c}{V(t)} = \frac{\delta}{\frac{V_{max} \cdot x}{K_m}} = \frac{K_m}{V_{max}}$$

→ tempo caratteristico di reazione
 → serve a valutare il fenomeno che prevale (DIFFUSIONE o CONVEZIONE)

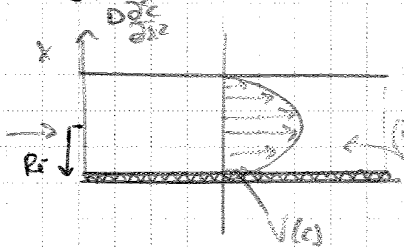
$$\rho^2 = \frac{t_{diff}}{t_{rea}} = \frac{L^2/D}{K_m/V_{max}} = \frac{L^2 V_{max}}{K_m D}$$

→ modulo di Thiele (serve a determinare quale fenomeno prevale!)

- Se $\rho^2 \sim 1$: $t_{diff} \sim t_{rea}$ → il tempo che impiega il fenomeno diffusivo è confrontabile al tempo che impiega il processo di consumo di ossigeno.
- Se $\rho^2 > 1$ $t_{rea} < t_{diff}$ → $V_{rea} > V_{diff}$
- Se $\rho^2 < 1$ $t_{diff} < t_{rea}$ → $V_{diff} > V_{rea}$

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \nabla^2 c - V(c) - (\vec{v} \cdot \nabla c)$$

CONVEZIONE (fluido in movimento)



cilindro pieno di fluido in movimento, con cellule sul fondo

$$t_{conv} = \frac{L}{\bar{v}}$$

$$G_z = \frac{t_{diff}}{t_{conv}} = \frac{\bar{v} R_i^2}{D}$$

(Se $G_z \sim 1$ i 2 tempi sono confrontabili)

Noi preferiamo le condizioni di $G_z < 1$ ($t_{diff} < t_{conv}$)

le cellule hanno "meno" il 50% di ossigeno

Le cellule producono dei rifiuti che devono essere trasportati via dal fluido:

Drift D_{O_2} $\Rightarrow G_z < 1$ (deve prevalere il fenomeno di convezione)

23/06/2013

SCAFFOLD:

Gli scaffold sono strutture composte da materiali scelti in base alle necessità, con il compito di fornire supporto alle cellule. Più piano le cellule riempiono lo spazio messo a disposizione dello scaffold.

L'obiettivo principale dello scaffold nel tempo è quello di favorire lo sviluppo del tessuto degradando più piano per lasciare spazio al nuovo tessuto (t di degradazione deve essere maggiore a quello di crescita del tessuto).

Lo scaffold deve essere citocompatibile e favorire l'adesione al substrato → esistono diversi test: valutazione diretta della tossicità, valutazione indiretta della tossicità, valutazione della