

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA CAMPUS
DI CESENA
DIPARTIMENTO DI
INGEGNERIA DELL'ENERGIA ELETTRICA E DELL'INFORMAZIONE
"GUGLIELMO MARCONI"

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

MONITORAGGIO DELLA VISCOELASTICITÀ DI UN
MODELLO DI COLTURA CELLULARE 3D PER LO STUDIO
DELLA FIBROSI EPATICA

Elaborato in

84230 - Fondamenti di Ingegneria dei Tessuti Biologici LM

Relatore

EMANUELE DOMENCO GIORDANO

Presentata da

FRANCESCA PIA MONACO

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

INDICE

CAPITOLO 1: IL FEGATO, FUNZIONAMENTO E PRINCIPALI PATOLOGIE

1. 1	Le funzioni del fegato.....	p. 1
1. 2	Anatomia del fegato.....	p. 2
1. 3	Funzionalità del fegato sano e principali patologie epatiche	p. 4
1. 3.1	Fibrosi e cirrosi epatica.....	p. 6
1. 4	I vantaggi dei modelli in vitro per studiare le tossicità.....	p. 11
1. 5	Comportamento meccanico in caso di patologie.....	p. 13
1. 6	Strategia per studiare risposta cellulare e adattamento a variazioni temporanee della meccanica del substrato durante la coltura.....	p. 15

CAPITOLO 2: Analisi dell'articolo "Il monitoraggio delle colture cellulari 3D con viscoelasticità in evoluzione nella ricerca di L. Cacopardo e A. Ahluwalia sulla fibrosi epatica"

2. 1	Introduzione.....	p. 19
2. 2	Motivazione della ricerca.....	p. 19
2. 3	La strategia di ricerca.....	p. 20
2. 4	Materiali e metodi.....	p. 20
2. 4.1	Il bioreattore MCTR.....	p. 20
2. 4.2	La reingegnerizzazione del bioreattore MCTR.....	p. 22
2. 4.3	La preparazione del gel di coltura cellulare.....	p. 22
2. 4.4	La quantificazione del contenuto in acqua e proteine.....	p. 24
2. 4.5	Il monitoraggio delle proprietà meccaniche.....	p. 24
2. 4.6	Step stress.....	p. 25
2. 4.7	La vitalità cellulare.....	p. 25
2. 5	L'elaborazione statistica.....	p. 26
2. 6	I risultati della ricerca.....	p. 26
2. 7	Conclusioni.....	p. 30

BIBLIOGRAFIA.....	p. 32
--------------------------	--------------

CAPITOLO 1

IL FEGATO, FUNZIONAMENTO E PRINCIPALI PATOLOGIE

1.1 Le funzioni del fegato

Con un peso di circa 1200-1600 grammi in età adulta, il fegato è l'organo più grande del corpo umano; è situato nella porzione superiore destra della cavità addominale (ipocondrio destro) ed è ancorato alla parete addominale e al soprastante diaframma per mezzo di legamenti sierosi e fibro-connettivali.

Riceve l'apporto ematico da due sistemi vascolari indipendenti: per il 25% dai rami di suddivisione dell'arteria epatica e per il 75% dai rami di suddivisione della vena porta. Il sangue refluo confluisce dal lobulo epatico nei vasi tributari delle vene sovraepatiche (destra, media e sinistra), affluenti della vena cava inferiore.

Svolge importanti funzioni di regolazione metabolica ed immunitaria e produce la bile.

La sua partecipazione al metabolismo si realizza mediante la sintesi e il deposito delle principali sostanze assunte con la dieta: carboidrati, lipidi, vitamine e proteine. È nel fegato che vengono smaltite molte sostanze tossiche di origine endogena (le scorie organiche prodotte da altri organi) ed esogena (principalmente farmaci). In tal modo viene regolata la concentrazione nel sangue di sostanze nutritive e di rifiuto.

La capacità epatica di utilizzare le sue cellule di Kupffer per depurare il sangue dai potenziali agenti patogeni, provenienti principalmente dall'intestino, ne fa un organo attivo a livello immunitario.

Una specifica funzione del fegato è la produzione della bile, che permette la digestione e l'assorbimento dei grassi e di tutte le altre sostanze lipofile,

come alcune vitamine, e rappresenta un mezzo per indirizzare all'intestino ed espellere le sostanze di scarto metabolico epatico.

Questo organo, inoltre, riveste un'importante funzione ematologica, rappresentando un vero e proprio serbatoio di sangue.

1.2 Anatomia del fegato

Nella descrizione topografica classica, il fegato è suddiviso in quattro lobi distinti dall'inserzione dei legamenti sospensori: destro, sinistro, caudato e quadrato. Sulla superficie posteriore del lobo destro è allocata la cistifellea, un'appendice di raccolta biliare.

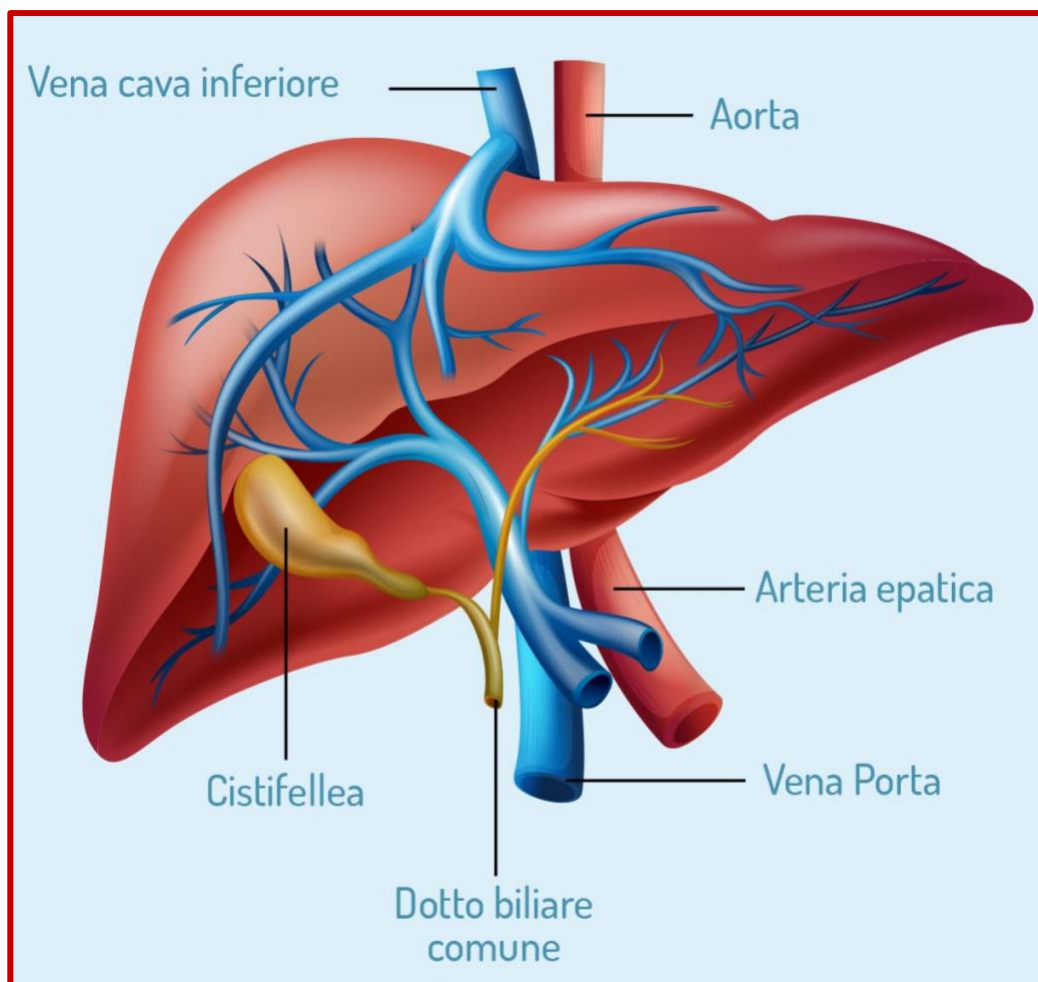


Fig. 1: anatomia del fegato

Fonte: <https://www.melarossa.it/fegato/>

A livello funzionale, seguendo la classificazione di Coinaud, la suddivisione del fegato in destro e sinistro è determinata dalla distribuzione dei vasi sanguigni. Ciascuna porzione è poi suddivisa in segmenti vascolarizzati da arteria epatica, vena porta e via biliare, unite da un fascio connettivale detto peduncolo glissoniano. Una scissura mediana nota come Cantlie Line, in corrispondenza della vena media sopraepatica, segna la suddivisione dell'emifegato destro da quello sinistro.

L'emifegato destro ha una parte anteriore e una parte posteriore, ciascuna costituita da un settore superiore e da uno inferiore.

Anche la porzione sinistra del fegato ha una parte anteriore e una posteriore, ma quest'ultima è più voluminosa e divisa in due segmenti dal legamento falciforme, sicché tutto il fegato risulta costituito da 9 segmenti, indicati con le cifre romane.

1.3 Funzionalità del fegato sano e principali patologie epatiche

Le cellule epatiche sono cellule epiteliali specializzate chiamate epatociti.

La funzione fagocitaria è svolta dalle cellule di Kupffer, macrofagi stellati che si trovano nel rivestimento dei sinusoidi.

L'unità funzionale del fegato è il lobulo epatico. In sezione trasversale i lobuli mostrano una forma esagonale e contengono sei triadi portali, ciascuna delle quali è costituita da un ramo dell'arteria epatica, un ramo della vena porta e un ramo del dotto biliare.

I canalicoli biliari veicolano la bile verso i duttuli biliari, che la convogliano nei dotti biliari interlobulari. I dotti epatici destro e sinistro convergono a formare il dotto epatico comune (Martini et al., 2019).

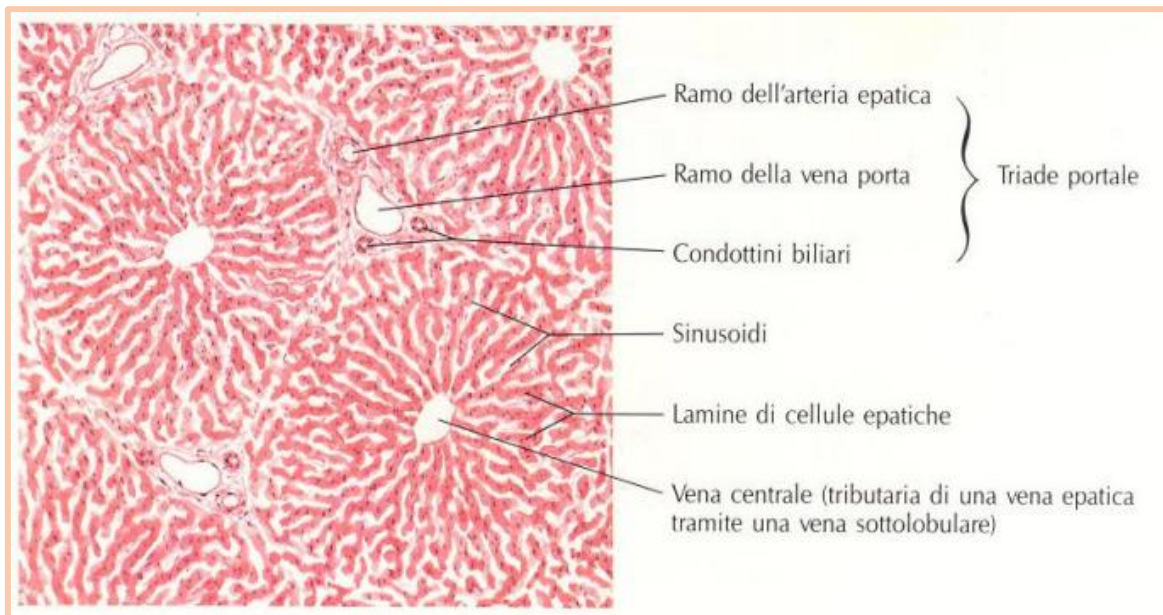


Fig. 2: *Aspetto lobulare normale del fegato*

fonte: <https://www.unife.it/medicina/lm.medicina/studiare/minisiti/medicina-interna-i-ed-oncoematologia/modulo-di-medicina-interna/2015-16/cirrosi-epatica-14-ottobre-2015-doot-gallerani.pdf>

Vi sono cellule fagocite deputate alla produzione di fattori proteici immunitari e alla rimozione dei batteri; la loro intensa attività durante le fasi acute delle infezioni microbiche migliora la risposta difensiva dell'organismo.

La reazione non enzimatica delle proteine con il glucosio (glicazione) è oggetto di attenzione crescente da parte dei ricercatori per il suo ruolo nell'invecchiamento e nella malattia dei tessuti connettivi (Snedeker e Gautieri, 2019).

Una localizzazione aberrante di linfociti T intestinali può contribuire all'instaurarsi di un danno epatico immunitario (Grassi F. et al, 2015).

Il sistema reticoloendoteliale epatico contiene numerose cellule attive contro gli antigeni e le tossine alimentari trasportate dal sistema portale. È stato recentemente ipotizzato che durante i processi patologici associati all'obesità, all'assunzione di alcol o ai processi autoimmuni, le interazioni tra queste cellule e il microbiota intestinale promuovano la progressione di malattie epatiche croniche come la cirrosi.

L'eziologia delle più comuni epatopatie croniche è legata ad infezioni da virus quali quello dell'epatite B (HBV) e quello dell'epatite C (HCV), dall'abuso di bevande alcoliche e dalla steatoepatite non-alcolica (NASH) (Parola, 2020). Un'infezione cronica da HCV può condurre a fibrosi e a cirrosi e persino esitare in carcinoma.

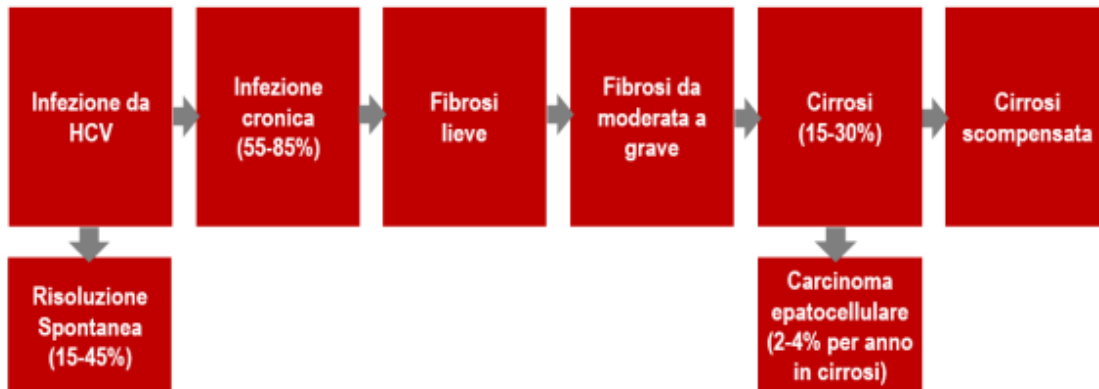


Fig. 2: Storia naturale dell'infezione da HCV.

Fonte: WHO. Guidelines for the screening care and treatment of persons with chronic hepatitis C infection. Updated version, April 2016.

1.3.1 Fibrosi e cirrosi epatica

Si è a lungo ritenuto che la fibrosi fosse dovuta al collasso della trama reticolinica in seguito a necrosi del tessuto parenchimatico (Popper H., 1970), ma studi condotti negli anni Settanta hanno dimostrato che il processo degenerativo è legato al progressivo depositarsi di collagene a livello di matrice extracellulare (ECM) (Chojkier M., et al 1988).

Negli anni Ottanta e Novanta le cellule stellate HSC (precedentemente chiamate cellule di Ito, lipociti o cellule perisinusoidali), deputate nel fegato sano ad immagazzinare vitamina A, sono state identificate come produttrici di ECM. (Friedman et al., 1985; Mather et al., 1990). Da allora, la fibrosi epatica è considerata l'espressione del modello di riparazione di un danno cronico a

carico della componente epiteliale epatica, cioè degli epatociti e/o dei colangiociti. Si è infine evidenziata l'importanza, nel processo patogenetico, della presenza di un infiltrato infiammatorio cronico e dell'attivazione di differenti tipi di proliferazione nella ECM (Svegliati-Baroni G. et al, 2008).

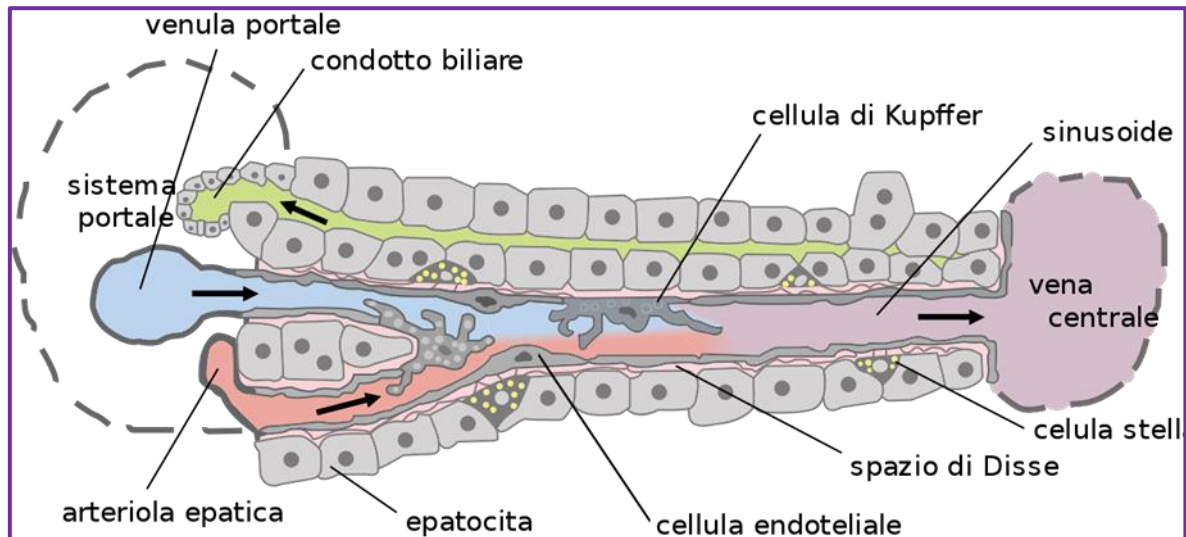


Fig. 3: *sinusoido epatico*

Fonte: https://it.wikipedia.org/wiki/Cirrosi_epatica#/media/File:Hepatic_structure2-it.svg

In risposta ad un danno epatocellulare acuto, le cellule parenchimali vanno incontro a replicazione, rimpiazzando le cellule necrotiche o apoptotiche, con limitata risposta infiammatoria e limitata deposizione di ECM, a cui fa seguito la *restitutio ad integrum* del parenchima offeso.

Se il danno epatico persiste nel tempo, questo tentativo di processo riparativo si protrae, ma con l'effetto di attivare elementi mesenchimali, che assumono un fenotipo miofibroblastico e producono un'eccessiva quantità di ECM e di collagene fibrillare (Kisseleva et al., 2008). Tali cellule transdifferenziate derivano soprattutto dalle cellule staminali ematopoietiche (HSC) (Gabele et al., 2003). Anche i fibroblasti portalì, localizzati nella zona più interna dei setti fibrosi, contribuiscono a questa popolazione cellulare, insieme ai fibrociti reclutati dal midollo osseo e derivanti da cellule staminali pluripotenti (Kisseleva et al.; Moore et al., 2005). Un'ulteriore produzione di miofibroblasti

è dovuta alle cellule epiteliali epatiche, epatociti e colangiociti, anch'esse localizzate nei setti fibrosi, che vanno incontro al processo di transizione epitelio-mesenchimale (EMT). Esse sono individuabili grazie alla colorazione per la proteina specifica dei fibroblasti (FSP-1).

Quando il danno epatico diventa cronico, le HSC attivate e i miofibroblasti di altra origine migrano e si accumulano nei siti di riparazione del danno, dove secernono una grande quantità di ECM e di collagene fibrillare per delimitare i noduli rigenerativi (Zavadil e Böttinger, 2005; Peifer e McEwen, 2002).

Diversi studi hanno dimostrato che lo stress ossidativo gioca un ruolo chiave nella fibrogenesi epatica: le specie reattive dell'ossigeno (ROS), rilasciate dalle cellule epatiche danneggiate, innescano meccanismi ossido-riduttivi all'interno delle HSC, inducendone l'attivazione e aumentando così la sintesi di collagene. (Svegliati-Baroni et al., 2001). D'altra parte, le stesse HSC possono essere un'importante fonte di specie reattive all'ossigeno in corso di fibrosi epatica, contribuendo quindi in maniera autocrina alla stimolazione del loro comportamento fibrogenetico (Cassiman et al., 2001).

Negli epatociti la principale fonte di ROS è il citocromo P450E1; nelle cellule di Kupffer la produzione dei ROS è mediata dall'attivazione della nicotinammide-adenina-dinucleotide-fosfato-ossidasi (NADPH-ossidasi) nella sua forma fagocitica, in risposta a stimoli quali i metaboliti dell'alcol e il tumor necrosis factor α (TNF α). Tali molecole conducono anche ad effetti proinfiammatori e all'apoptosi degli epatociti, con conseguente evoluzione del danno epatico cronico verso la fibrosi. Nelle HSC è invece espressa la forma non fagocitica del complesso NADPH-ossidasi, quindi sono esse stesse a produrre le specie reattive all'ossigeno che ne promuovono *in vitro* l'attivazione e la fibrogenesi (De Minicis et al., 2006).

Ad innescare tale meccanismo degenerativo con l'attivazione dei miofibroblasti sono anche diverse citochine, tra le quali la più potente in tutti i tessuti risulta essere il fattore di crescita trasformante β 1 (TGF β 1), seguito da

adipocitochine come la leptina, coinvolte nell'infiammazione epatica. La ricerca indica che stimoli paracrini ad azione sulle HSC possono derivare da fonti esterne al fegato, e in particolare dalla traslocazione batterica intestinale, con reclutamento a livello epatico di cellule infiammatorie e stimolo alla progressione della fibrosi epatica. Un recente studio ha dimostrato come il lipopolisaccaride originato dai batteri intestinali Gram negativi, interagendo con lo specifico recettore (Toll-like receptor-4, TLR-4), innesca l'attivazione delle HSC, aumentando l'attività del TGF β 1 (Seki *et al.*, 2007). Infine, non sembra essere estraneo alla progressione della fibrosi epatica neppure il sistema neuroendocrino, con un ruolo ancora da precisare (Oben *et al.*, 2003; Sato *et al.*, 2003).

Gli studi *in vitro* mostrano che le HSC esprimono recettori per gli oppioidi endogeni come la metenkefalina e sono da questi stimolati a sintetizzare il collagene. Tale attività, aumentata in condizioni di danno colestatico cronico del fegato, modula la proliferazione e la fibrogenesi (De Minicis *et al.*, 2008). Gli oppioidi endogeni, infatti, risultano aumentati nel corso di danno epatico cronico negli epatociti e/o colangiociti (a seconda della patologia di base). Nella sperimentazione *in vivo*, bloccando tale interazione con un inibitore aspecifico del recettore degli oppioidi (il naloxone) si assiste ad una ridotta deposizione di ECM (Roskams *et al.*, 2004).

Recentemente, una ricerca condotta su modello animale dal German Cancer Research Center (Deutsches Krebsforschungszentrum, DKFZ) e della Medical Faculty in Mannheim alla Heidelberg University, ha condotto ad una promettente scoperta: una proteina chiamata endosialin e presente sulla superficie delle cellule stellate epatiche promuove la produzione di tessuto cicatriziale, mentre modificazioni genetiche che privano tali cellule della proteina riducono significativamente lo sviluppo di fibrosi epatica dopo un danno prolungato al fegato (Mogler *et al.*, 2015). Ulteriori speranze di invertire

i processi della fibrogenesi derivano dagli studi che mostrano il coinvolgimento dei recettori della dopamina (Haak et al., 2019).

La cirrosi epatica rappresenta l'esito di un danno epatico cronico, quando gli epatociti sono andati ormai distrutti e sostituiti da estesa fibrosi. Il tessuto cicatriziale blocca parzialmente il flusso del sangue diretto verso il fegato e a causa di queste lesioni l'organo perde la sua normale funzione di:

- controllare le infezioni;
- eliminare i batteri e le tossine dal sangue;
- controllare il processo di elaborazione di nutrienti, ormoni e farmaci;
- produrre le proteine che regolano la coagulazione del sangue;
- produrre la bile per aiutare ad assorbire i grassi, tra cui il colesterolo, e le vitamine liposolubili.

L'importanza clinica della cirrosi epatica è legata alla progressiva riduzione della capacità funzionale del fegato, fino all'insufficienza epatica, all'ipertensione portale e all'eventuale insorgenza di carcinomi. (Benvegnu L. et al, 2004).

L'origine della cirrosi può essere diversa.

Una comune causa d'insorgenza è l'eccessiva assunzione di alcol etilico, metabolizzato in via quasi esclusiva dagli epatociti. Gran parte degli effetti epatotossici dell'etanolo sono da attribuirsi alla formazione di acetaldeide: il suo accumulo intracellulare riduce l'ossidazione mitocondriale e aumenta la deposizione di ECM, in particolare di fibre collagene, come aberrante tentativo di riparazione e formazione di noduli rigenerativi (cicatrici). (Guo J. et al, 2007). Inoltre, l'alcol causa alterazioni strutturali del DNA delle cellule epatiche e dell'organizzazione dei microtubuli citoplasmatici. Di conseguenza, risulta compromessa la regolare sintesi proteica (Grassi F., 2015).

Le epatiti C e B, cronicizzate, sono anch'esse causa di cirrosi, provocando infiammazione e progressivi danni al fegato.

Altra condizione di rischio è l'epatopatia steatosica non alcolica, associata all'obesità, al diabete, alla malnutrizione proteica, alla malattia coronarica e ai farmaci corticosteroidi. La steatosi è caratterizzata dall'accumulo di grasso nel fegato ed evolve in cirrosi.

La stessa epatite autoimmune, dovuta a disfunzioni immunitarie prevalenti nel sesso femminile, attacca le cellule del fegato e causa infiammazione, danno epatico ed infine cirrosi.

Le malattie che danneggiano o distruggono i dotti biliari, come la colangite sclerosante, provocano il ritorno al fegato della bile e conseguente cirrosi epatica.

Ulteriori cause di cirrosi sono alcune malattie ereditarie quali la fibrosi cistica, l'alfa-1 antitripsina, l'emocromatosi, la malattia di Wilson, la galattosemia e le malattie da accumulo di glicogeno, che interferiscono con l'elaborazione di enzimi, proteine, metalli ed altre sostanze necessarie al corretto funzionamento dell'organismo.

Infine, l'abuso di farmaci, l'esposizione prolungata a sostanze chimiche tossiche, le infezioni parassitarie e i ripetuti attacchi di insufficienza cardiaca sono alla base di congestione del fegato e potenzialmente causa di cirrosi.



Fig. 4: *Cirrosi Epatica*

Fonte: <http://www.epac.it/patologie/cirrosi>

1.4 I vantaggi dei modelli *in vitro* per studiare le tossicità

Combinando l'uso dei diversi modelli di colture cellulari e tissutali, i meccanismi alla base dello sviluppo della fibrosi possono essere studiati *in vitro* per identificare le proprietà pro o anti-fibrotiche di varie sostanze e i loro potenziali effetti avversi (Van De Bovenkamp et al., 2007).

Fette di tessuto epatico, microsomi isolati, fegato perfuso, linee cellulari immortalate ed epatociti primari sono stati ampiamente utilizzati a tal fine. Le linee cellulari immortalate e le cellule epatiche primarie isolate sono attualmente i modelli *in vitro* più utilizzati per i test di tossicità epatica. Il *throughput* limitato, la perdita di vitalità e la diminuzione della funzionalità e dell'espressione genica specifiche del fegato sono i limiti comuni di questi modelli. I recenti sviluppi nel campo dell'epatotossicità *in vitro* includono costrutti tissutali tridimensionali e fegati bioartificiali, co-colture di vari tipi cellulari con epatociti e differenziazione delle cellule staminali in cellule simili al lignaggio epatico.

Per fornire un ambiente fisiologico alle cellule epatiche in coltura, alcuni dei nuovi sistemi incorporano flusso di fluidi, microcircolazione e altre forme di microambienti organotipici. Le co-colture mirano a preservare la morfologia e la funzionalità specifiche del fegato, oltre quelle fornite dalle colture di cellule parenchimali pure. Le cellule staminali, derivate da tessuto sia embrionale che adulto, possono offrire una fornitura illimitata di epatociti da più individui per migliorare la riproducibilità e consentire il test della tossicità specifica sull'individuo (Soldatow et al., 2013).

L'approccio tossicologico *gold standard* per la valutazione della tossicità chimica prevede complessi studi *in vivo* che tuttavia vengono limitati per motivi di etica sperimentale sul benessere animale, per gli elevati costi e per il numero crescente di sostanze chimiche che richiedono di essere testate.

Inoltre, i test *in vivo* sui roditori sono oggetto di controversie per la scarsa predittività sulla salute umana (Holmes et al., 2010).

L'uso di sistemi modello *in vitro* presenta molti vantaggi, in particolare nei test di tossicità: la diminuzione del numero di animali utilizzati allo scopo, il costo stesso del mantenimento e della cura delle cavie, la riduzione quantitativa delle sostanze chimiche necessarie, il minor tempo necessario e l'aumento della produttività per la valutazione di più sostanze chimiche e i loro metaboliti (Le Cluyse et al., 1996).

Inoltre, i sistemi *in vitro* consentono ai ricercatori di studiare il metabolismo chimico, valutare i meccanismi di tossicità, misurare la cinetica degli enzimi ed esaminare le relazioni dose-risposta (Del Raso, 1993).

Quest'ultimo aspetto è di cruciale importanza, dal momento che negli studi *in vivo* si utilizzano tipicamente dosi di composti vari ordini di grandezza maggiori di quelli a cui sono esposti gli esseri umani. L'estrapolazione da tali dosi elevate di livelli di esposizione adatti ad organismi umani è sempre difficile e imprecisa. Inoltre, gli studi *in vivo* esaminano la risposta di un animale nel passaggio da un laboratorio standard a uno contaminato, condizione difficile a verificarsi alle persone. Ancora più importante è che la popolazione umana è molto eterogenea e un singolo ceppo animale non può prevedere con precisione la variabilità nelle risposte osservabile su larga scala. Infine, l'esposizione *in vivo* a composti tossici riguarda un'unica sostanza, laddove l'uomo di solito è esposto a miscele di composti la cui combinazione è difficilissima da esaminare per il gran numero di sostanze e le differenti combinazioni, oltre che per i tempi richiesti dagli studi.

Il fegato è il principale organo che metabolizza i farmaci, quindi utilizzare le cellule epatiche per i test tossicologici e farmacologici è la scelta più idonea e a più alto rendimento gli effetti delle sostanze tossiche sull'organismo e la sperimentazione *in vitro* la metodica più indicata perché diretta.

I modelli di questo genere rappresentano un'enorme risorsa e consentono un migliore utilizzo dei metodi di prova di tossicità (Judson et al., 2009).

1.5 Comportamento meccanico in caso di patologie

Il fegato sano ha un modulo elastico (E) di pochi kPa, che aumenta fino a 20 kPa nell'ultimo stadio della fibrosi (Yin et al., 2007). L'aumento del collagene influisce sulla viscosità del tessuto epatico che, in diversi studi, è risultata raddoppiata (Asbach et al., 2008). Tali alterazioni provocano disfunzioni d'organo e portano a malattie come l'ipertensione portale e l'insufficienza epatica (Sun et al., 2011).

La fibrosi modifica le proprietà meccaniche del fegato e ne riduce l'elasticità. Per studiare i potenziali benefici dell'*imaging* di elasticità ultrasonica sono stati studiati diciannove campioni di fegato umano e un campione di tumore epatico (iperplasia nodulare focale), ottenuti durante interventi chirurgici. Sono state eseguite semplici stime 1-D basate sul metodo ciclico di compressione-rilassamento.

I valori del modulo elastico sono stati ricavati dalla deformazione predeterminata e dai valori di sollecitazione (misurati da una bilancia elettronica).

Ciascun campione è stato, successivamente, sottoposto ad esame istologico e il grado di fibrosi epatica è stato valutato da 0 a 5. I valori risultanti erano dell'ordine di alcune centinaia o migliaia di Pascal.

Il modulo elastico aumentava generalmente con il grado di fibrosi, sebbene esistessero alcune discrepanze nei gradi di fibrosi medi (punteggi da 1 a 3). La correlazione tra il punteggio della fibrosi e il modulo elastico mostrava un andamento quadratico e si è rivelata statisticamente significativa ($p < 0,01$ nell'analisi della correlazione di Pearson). La gravità della fibrosi correla quindi positivamente con la rigidità del fegato. I risultati dello studio hanno

anche mostrato che l'*imaging* dell'elasticità epatica può fornire valori clinici significativi se il modulo elastico può essere misurato con precisione (Yeh, 2002).

Modelli avanzati in vitro (IVM) sono stati sviluppati per ricapitolare il microambiente epatico utilizzando diversi tipi di idrogel con moduli elastici compresi tra 0,4 e 22 kPa (ad es. Matrigel, poliacrilammide, collagene, alginato e agarosio) (Hansen et al., 2005). Tuttavia, nonostante gli sforzi verso la generazione di IVM epatici mecano-mimetici, in letteratura si trovano solo pochi esempi di substrati viscoelastici in grado di riprodurre la transizione da organo sano a organo fibrotico. Così, ad esempio, Guvendiren e colleghi hanno dimostrato che il modulo elastico dei gel di acido ialuronico metacrilato (MeHA) può variare da 2 kPa (rigidità sana) a 24 kPa (rigidità fibrotica) dopo l'esposizione alla luce ultravioletta (UV) (Guvendiren et al., 2014).

Si avverte l'esigenza di sviluppare biomateriali in cui la viscoelasticità possa essere regolata per imitare la natura dinamica dei microambienti tissutali. Il modello si qui utilizzato per creare sistemi di idrogel che simulino la meccanica dei noduli di tessuto fibrotico circondati da tessuto sano hanno permesso di capire che le cellule rispondono alla meccanica locale del substrato modellato con una maggiore diffusione nelle regioni che imitano la fibrosi. Per questo motivo Hui et al. hanno utilizzato la luce UV per passare da un gel morbido ad uno rigido (Hui et al., 2019). Questi idrogel primari di cellule stellate capaci di irrigidirsi con la mediazione della luce visibile permettono di studiare la mecano-trasduzione e mostrano una cinetica di segnalazione accelerata di entrambi i primi e tardivi marcatori della differenziazione di miofibroblasti, risultando in un andamento temporale simile alla dinamica di attivazione osservata in vivo. Il sistema è stato ulteriormente convalidato, dimostrando che gli idrogel di irrigidimento possono essere modelli più fedeli per lo studio dell'attivazione dei miofibroblasti rispetto ai substrati statici e potrebbero informare lo sviluppo di terapie per la malattia (Caliari et al., 2016).

1.6 Strategia per studiare risposta cellulare e adattamento a variazioni temporanee della meccanica del substrato durante la coltura

Da un punto di vista meccanico, una ECM nativa è viscoelastica ed altera le sue proprietà meccaniche in relazione ai processi fisiopatologici legati all'invecchiamento. La ricerca, quindi, si è concentrata sullo sviluppo di substrati con rigidità variabile. Mattei ed altri parlano di un nuovo metodo ingegneristico per la preparazione di substrati viscoelastici dinamici, in cui i parametri possono cambiare o evolversi nel tempo, fornendo uno strumento per studiare la risposta cellulare al microambiente meccanico. In particolare, è stata implementata una strategia di reticolazione in due fasi (chimica ed enzimatica) per modulare le proprietà viscoelastiche degli idrogel di gelatina. Sono stati sviluppati gel con diverse concentrazioni di glutaraldeide per imitare un'ampia gamma di comportamenti viscoelastici dei tessuti molli. Il loro comportamento meccanico è stato modulato nel tempo utilizzando la transglutaminasi microbica.

Le alterazioni meccaniche indotte enzimaticamente sono state verificate entro le prime 24 h di reazione e le proprietà elastiche si sono mantenute quasi costanti per un massimo di sette giorni. I test preliminari di coltura cellulare hanno mostrato che le cellule aderiscono ai gel e la loro vitalità è simile a quella dei controlli (Mattei et al., 2020).

Dopo gli studi condotti su colture cellulari 2D, la sfida era rappresentata dalla condizione di coltura 3D, più vicini ai sistemi naturali *in vivo*. (Ravi et al., 2015).

La maturazione tridimensionale *in vitro* (IVM 3D) è un approccio promettente per migliorare l'efficienza dell'IVM in quanto potrebbe prevenire l'appiattimento del complesso cumulo-ovocita (COC) e preservarne l'integrità strutturale e funzionale. Un processo di produzione è stato ottimizzato basandosi sulla biostampa per la generazione di microsferi contenenti un COC

(COC-microbeads) e la sua validità è stata testata in un modello animale di grandi dimensioni (pecora). Sono state così prodotte microsfeere di alginato che sono state caratterizzate per dimensione, forma e stabilità.

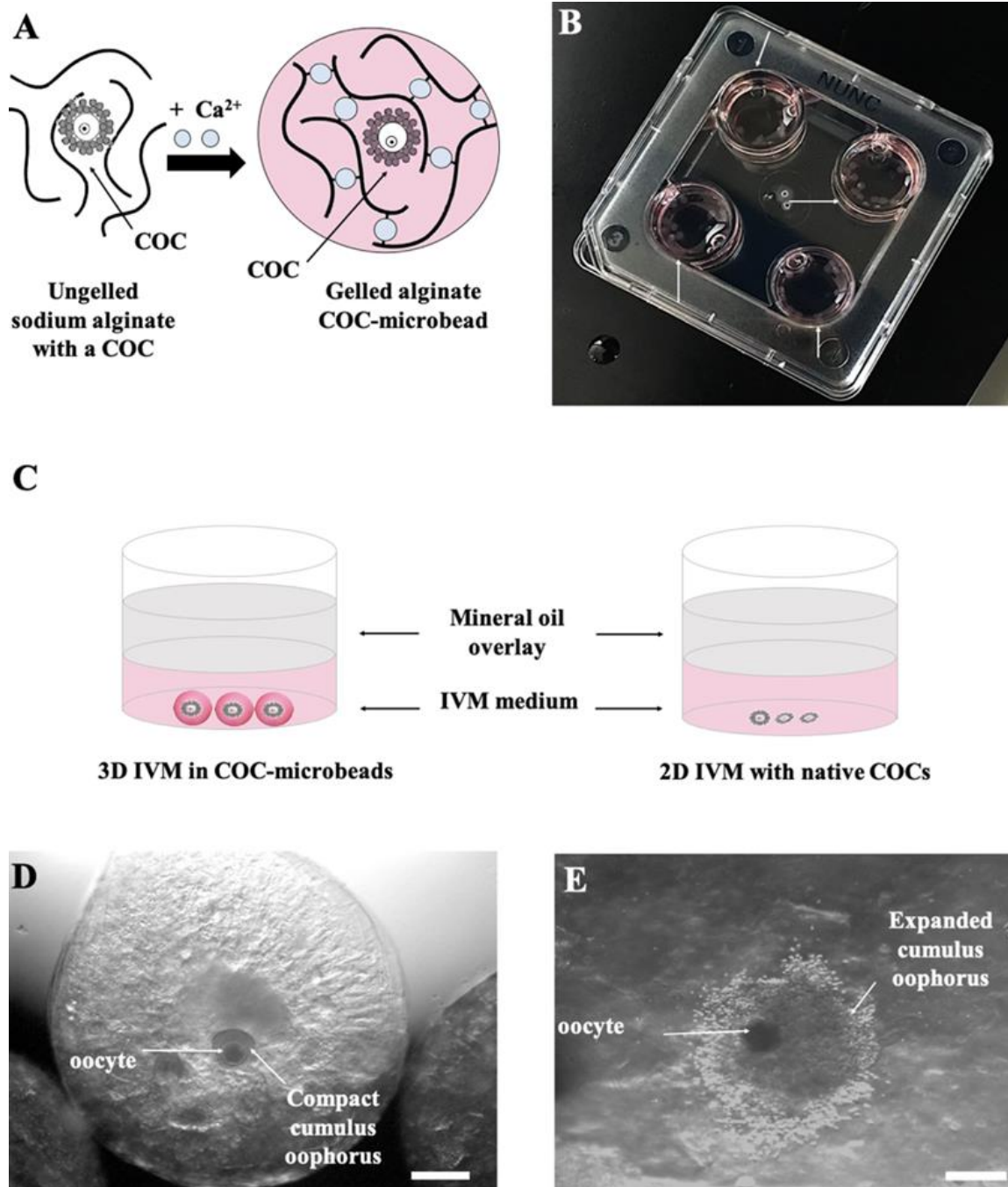


Fig. 5: *L'incapsulamento COC*

fonte <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0238812>

Dopo la IVM, gli ovociti sono stati analizzati per la configurazione della cromatina nucleare, lo stato bioenergetico/ossidativo e l'attività trascrizionale dei geni biomarcatori dell'attività mitocondriale (TFAM, ATP6, ATP8) e della competenza dello sviluppo degli ovociti (KHDC3, NLRP5, OOEP e TLE6). Il sistema 3D ha supportato la maturazione nucleare degli ovociti in modo più efficiente rispetto al controllo 2D ($P < 0,05$). L'attività mitocondriale ooplasmatica e la capacità di generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) sono state aumentate ($P < 0,05$). La sovraregolazione di TFAM, ATP6 e ATP8 e la sottoregolazione dell'espressione di KHDC3, NLRP5 sono state osservate in 3D IVM. In conclusione, il nuovo metodo di bioprinting per la produzione di microsferi COC ha un'elevata riproducibilità ed efficienza. Inoltre, 3D IVM migliora la maturazione nucleare degli ovociti e i parametri rilevanti della maturazione citoplasmatica degli ovociti e potrebbe essere utilizzato per applicazioni cliniche e tossicologiche. Questo metodo di stampa 3D può essere utilizzato per studiare la fibrosi epatica *in vitro* (Mastrorocco et al., 2020).

CAPITOLO 2

Analisi dell'articolo

“Il monitoraggio delle colture cellulari 3D con viscoelasticità in evoluzione nella ricerca di L. Cacopardo¹ e A. Ahluwalia² sulla fibrosi epatica”

2.1 Introduzione

Tra i componenti della ECM epatica vi sono glicoproteine e proteoglicani che, essendo polimeri ad elevata idratazione e a bassa densità, conferiscono al tessuto epatico una grande viscoelasticità (Bedossa e Paradis, 2003).

La fibrosi si associa ad una iperproliferazione e differenziazione di fibroblasti in miofibroblasti. Questi secernono collagene e fanno aumentare l'elasticità del tessuto epatico fino a valori di 20 kPa³ negli stadi più avanzati di fibrosi (Yeh, 2002). Di conseguenza, aumenta anche la viscosità tissutale.

Tali alterazioni provocano le note disfunzioni del fegato ammalato, come l'ipertensione portale e l'insufficienza epatica (Cox e Erler, 2011).

¹ Ludovica Cacopardo è ricercatrice presso il Centro di Ricerca “Enrico Piaggio” dell'Università di Pisa.

² Arti Devi Ahluwalia è Ordinaria di ingegneria e biomeccanica dei tessuti e macchine biomediche presso il Dipartimento di Ingegneria dell'Informazione del Centro di Ricerca “Enrico Piaggio” di Pisa.

³ La rigidità G delle cellule stellate (rigidità fibrotica) corrisponde al numero di KPa misurato (Guvendiren et al., 2014).

2.2 Motivazione della ricerca

La transizione del tessuto epatico da una condizione sana ad una condizione fibrotica è stata oggetto di un numero esiguo di studi, peraltro limitati alla coltura 2D.

Le ricercatrici Cacopardo e Ahluwalia hanno inteso indagare tale transizione in coltura 3D, sviluppando una strategia per coltivare gli epatociti in idrogel a base di gelatina con proprietà viscoelastiche (Mattei, Cacopardo e Ahluwalia, 2020). Sottoposto all'azione di raggi UV, infatti, l'idrogel aumenta la sua rigidità, ma i raggi UV sono citotossici e così si è fatto ricorso alla luce blu per modulare il grado di rilassatezza/rigidità (Caliari et al., 2016).

2.3 La strategia di ricerca

La strategia adottata da Cacopardo e Ahluwalia, pubblicata in *Bioengineering* 2021,8,106 con DOI: 10.3390/bioengineering8080106, si basa su un processo a due fasi di reticolazione enzimatica che utilizza la transglutaminasi microbica (mTG) come catalizzatore per la formazione di legami covalenti tra glutammina e ammidi di lisina (Hoffman, 2012).

La mTG, che stabilizza chimicamente il gel, è presente in vari organismi vegetali ed animali, compreso l'uomo, e la sua viscoelasticità è modulabile con glutraldeide (Mattei et al., 2020). La gelatina, polimero idrofilo derivato dal collagene, è viscoelastica come l'ECM ed è biocompatibile.

Per modulare il cambiamento nelle proprietà meccaniche delle reticolazioni covalenti mediate da enzimi, se ne modifica la cinetica di reazione variando opportunamente i parametri da cui dipende (Hennink e Nostrum, 2012):

- struttura e composizione del polimero;
- rapporto tra concentrazione del reagente e concentrazione dell'enzima;
- temperatura e pH.

2.4 Materiali e metodi

2.4.1 Il bioreattore MCTR

Un bioreattore è un'apparecchiatura che fornisce un ambiente adeguato alla crescita di organismi e tessuti biologici, mantenendo i parametri ottimali di agitazione, temperatura, pH e livello di ossigenazione (o anaerobiosi). Grazie a strumenti di questo tipo è possibile coltivare cellule, antibiotici, vaccini e tessuti di grande importanza medica.

I bioreattori possiedono sistemi di rilevamento integrati per caratterizzare i tessuti, che tuttavia non sono adatti a testare nel tempo i tessuti molli come i modelli avanzati in vitro del fegato.

Per monitorare il comportamento viscoelastico di questi campioni senza danneggiarli occorre eseguire prove meccaniche nella loro regione viscoelastica lineare (LVR) e a tal fine con l'azienda canadese CellScale è stata sviluppata una versione a bassa forza del bioreattore Mechano Culture Tank Reactor (MCTR).

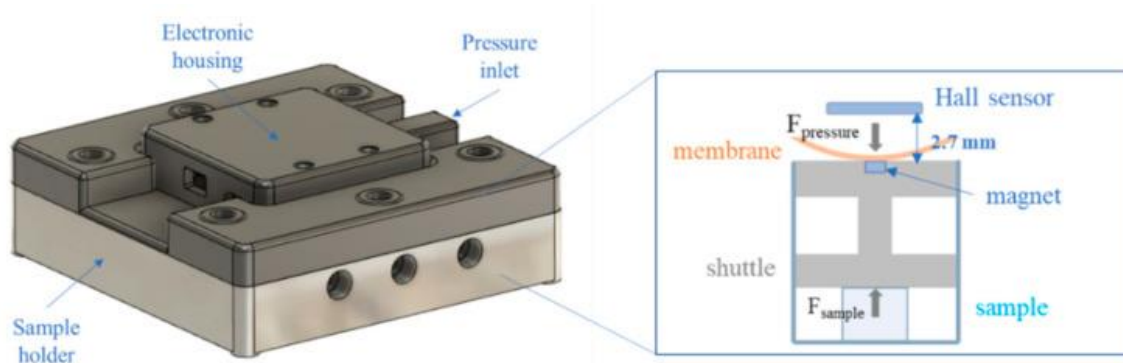


Fig. 6: Disegno tecnico del bioreattore MCTR a bassa forza (a destra) e rappresentazione di un pozzo (a sinistra)

Fonte: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8389340/figure/bioengineering-08-00106-f001/>

Il bioreattore MCTR è costituito da 9 pozzetti (tank) al cui interno vi sono le celle per la coltura cellulare, con un magnete cilindrico di 10 mm di diametro e di 2,5 mm di altezza.

Alla camera sopra i pozzetti viene applicata una pressione che deforma la membrana di separazione tra i due compartimenti. Per comprimere i campioni con una forza nota il bioreattore è dotato di un regolatore di pressione, mentre dei sensori ad effetto Hall ne monitorano lo spostamento.

2.4.2 La reingegnerizzazione del bioreattore MCTR

Nella ricerca effettuata da Cacopardo e Ahluwalia, alla versione commerciale del bioreattore sono state apportate delle modifiche:

- Per consentire delle misurazioni a bassa forza, al posto del regolatore di pressione da 5 a 500 kPa con risoluzione di 0,1 kPa e funzionamento con *range* di forza da 2 a 110 N è stato inserito un regolatore di pressione da -7 kPa (QPV1, Equilibar, Fletcher, NC, USA) con una risoluzione di 0,35 mPa;
- Per ridurre al minimo la precompressione del campione, sono stati utilizzati una navetta di acido polilattico (PLA) e magneti di dimensioni inferiori ($2,5 \times 1$ mm), con peso massimo di 15 mN;
- Per diminuire la distanza tra magneti e sensori in relazione alla riduzione del campo magnetico, essi sono stati ricalibrati;
- La membrana 60 A in silicone alimentare è stata sostituita con una 10 A.

Tabella 1: Modifiche tecniche apportate al bioreattore

Differenze tra il bioreattore MCTR a bassa forza e quello commerciale.		
	Versione a bassa forza	Versione commerciale
Regolatore di pressione	Intervallo: 0–7 kPa Risoluzione: 0,35 mPa	Intervallo: 5–500 kPa Risoluzione: 0,1 kPa
Durezza della membrana	10A	60A
Dimensioni del magnete (diametro × altezza)	2,5 × 1 mm	10 × 2,5 mm
Materiale navetta	PLA	Acciaio inossidabile

2.4.3 La preparazione del gel di coltura cellulare

Le ricercatrici hanno preparato il gel per la coltura cellulare con reagenti prodotti da Sigma-Aldrich (Milano, Italia): terreno Eagle modificato (MEM) con 10% di FBS, 1% di L-glutammina ed 1% di penicillina/streptomina.

Le cellule HepG2 (3×10^5 cellule/mL), derivate da carcinoma epatico umano, sono state incapsulate in gelatina al 5% p/v (Tipo A, G2500, Sigma-Aldrich) pre-reticolata con 5 Unità/grammo (U/g) mTG.

La polvere di gelatina è stata esposta per circa 30 min ai raggi UV allo scopo di sterilizzarla, quindi è stata disciolta in un mezzo di coltura caldo (circa 50°C), ottenendo una soluzione di gelatina al 10% che è stata poi mantenuta a 37°C. L'enzima è stato diluito nel mezzo di coltura cellulare a una concentrazione di 10 U/g a 37°C ed è stato sterilizzato per filtrazione.

Le due soluzioni sono state miscelate tra loro, ottenendo la soluzione finale di mTG-gelatina.

Le cellule da coltivare sono state sospese nella soluzione sterile di mTG e mescolate con la soluzione di gelatina che è stata infine colata in stampi di polidimetilsilossano (PDMS) (8 mm di altezza, 13 mm di diametro). L'incubazione è avvenuta a 37 ° C per 8 ore.

Nella prima fase di reticolazione la mTG necessaria per stabilizzar il gel a base di gelatina a 37 °C è endogena.

Nella seconda fase di reticolazione, che consente la modulazione della viscoelasticità del gel nel tempo, i gel sono stati immersi in un mezzo contenente 100 U/g di mTG esogena e lasciati in coltura per 11 giorni. Il mezzo contenente mTG è stato sostituito ogni 3 giorni.

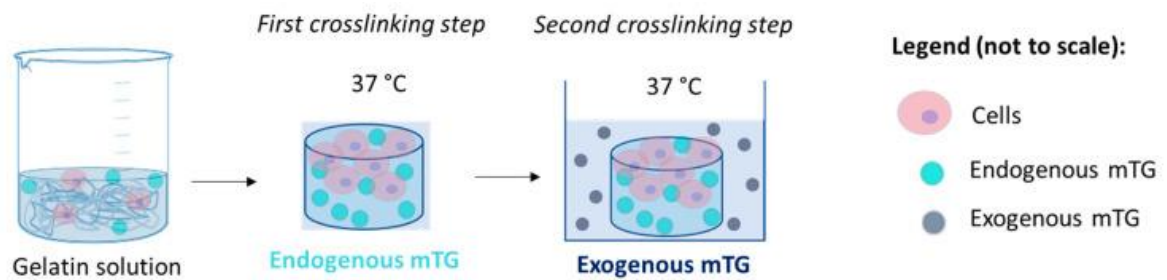


Fig. 7: Le due fasi di reticolazione nella preparazione del gel cellulare, con mTG endogena ed esogena.

fonte <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8389340/figure/bioengineering-08-00106-f002/>

2.4.4 La quantificazione del contenuto in acqua e proteine

Per quantificare il contenuto proteico del gel a mTG endogena (G) e del gel a mTG esogena (G-ex) sono stati raccolti dei campioni il primo, il settimo e l'undicesimo giorno ed è stato svolto il test dell'acido bicinconinico (BCA) (71285 Millipore, Burlington, MA, USA). La degradazione del gel è stata calcolata come percentuale di massa proteica rilasciata rispetto alla massa iniziale di gelatina e mTG presente nei campioni.

Il contenuto in acqua dell'idrogel è stato calcolato nei medesimi giorni come differenza tra la massa del gel idratato e quella della massa proteica secca: per ciascun campione è stata calcolata la massa proteica secca effettiva, considerando la perdita di proteine.

2.4.5 Il monitoraggio delle proprietà meccaniche

Nel bioreattore sono state monitorate le proprietà meccaniche dei due tipi di gel: quello con le cellule coltivate in presenza di mTG esogena (CG-ex) e quello con le cellule coltivate in assenza di mTG esogena (CG). Anche per queste misurazioni i test sono stati ripetuti nel primo, settimo e undicesimo giorno.

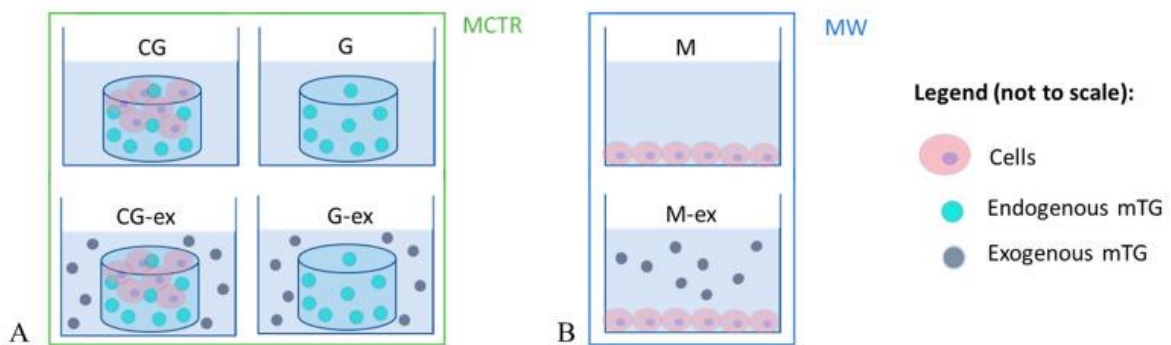


Fig. 8: (A) campioni testati nel bioreattore (CG = cellule in gel senza mTG esogena; CG-ex = cellule in gel con mTG esogena; G = gel; G-ex =gel con mTG esogena); (B) monostrati in piastre multipozzetto coltivate in assenza (M) e in presenza di mTG esogena (M-ex). fonte <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8389340/figure/bioengineering-08-00106-f002/>

2.4.6 Step stress

Il metodo sigma-dot è stato sviluppato dal Centro di Ricerca E. Piaggio per misurare la viscoelasticità delle colture cellulari *in vitro* a differenti tassi di stress. Il metodo imita l'evoluzione meccanica del microambiente associata alla fibrosi epatica ed è utilizzabile per fornire informazioni sui processi fisiopatologici di stress che nel tempo fanno modificare le proprietà elastiche e viscosi dei tessuti, rendendoli più elastici (Cacopardo e Ahluwalia, 2021).

Il principale vantaggio del sigma-dot rispetto ai classici test viscoelastici *step-response*, come *creep* e *stress-relaxation*, è la possibilità di fornire input implementabili senza partire da alcuna determinazione a priori della viscoelasticità del campione (Cacopardo et al., 2020).

La deformazione del gel in funzione del tempo, utilizzando parametri di elasticità come e_0 (in fase iniziale) ed e_1 (dopo un certo tempo), fornisce il modulo elastico di equilibrio $e_{eq} = \frac{e_0 e_1}{e_0 + e_1}$.

2.4.7 La vitalità cellulare

Osservando i gel al microscopio (Olympus—Tokyo, Giappone), si è valutata la vitalità cellulare con Alamar Blue (Sigma-Aldrich-Milano, Italia) nei giorni 0, 4, 7 e 11.

Per testare la citotossicità di mTG, il giorno 0 e l'undicesimo giorno si è misurata la vitalità cellulare in presenza (M-ex) o in assenza (M) di 100 U/g di mTG. I nuclei cellulari sono stati colorati con DAPI e actina con falloidina verde coniugata con Alexa fluor 488 (ThermoFisher, Waltham, MA, USA). Le immagini sono state acquisite con un microscopio confocale (Nikon A1, Tokio, Giappone).

2.5 L'elaborazione statistica

Gli strumenti statistici utilizzati sono stati i seguenti:

- L'analisi della varianza (test ANOVA) e il test di confronto multiplo di Tukey per la degradazione del gel e l'analisi del contenuto d'acqua di G e G-ex e per la vitalità di CG e CG-ex;
- L'analisi di ANOVA unidirezionale seguito dal test di confronto multiplo di Sidak per i descrittori viscoelastici di G, CG, G-ex e CG-ex;
- Il test t di Student per la M e M-ex.

Tutti i test sono stati eseguiti tre volte ($n = 3$) e tutte le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA), impostando la significatività a $p < 0,05$.

2.6 I risultati della ricerca

Come mostra la figura 9, in G il contenuto iniziale di acqua è rimasto sostanzialmente invariato nel corso del tempo, restando maggiore rispetto a G-ex. Al contrario in G-ex, che già aveva meno acqua all'inizio della ricerca, la progressiva disidratazione era correlata alla reticolazione esogena di mTG.

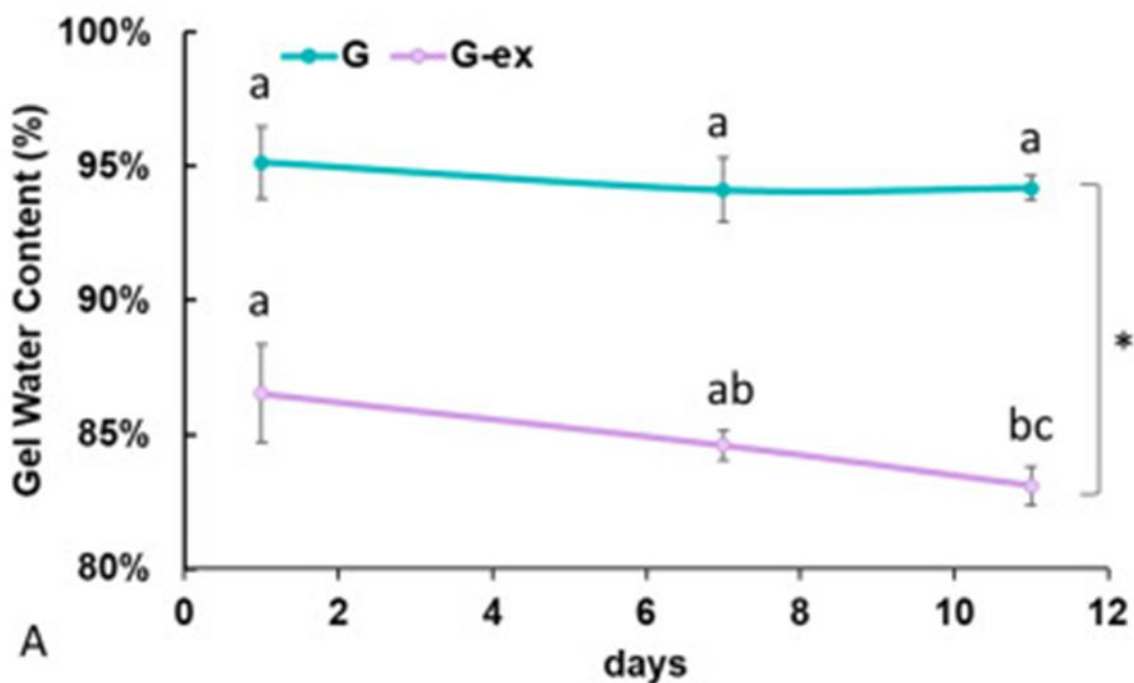


Fig. 9: Contenuto di acqua in G (grafico celeste) e in G-ex (grafico viola)

È stato osservato che mTG favorisce la resistenza del gel all'attacco idrolitico, infatti G-ex non ha subito degradazione, mentre G si è molto degradato in 11 giorni di ricerca.

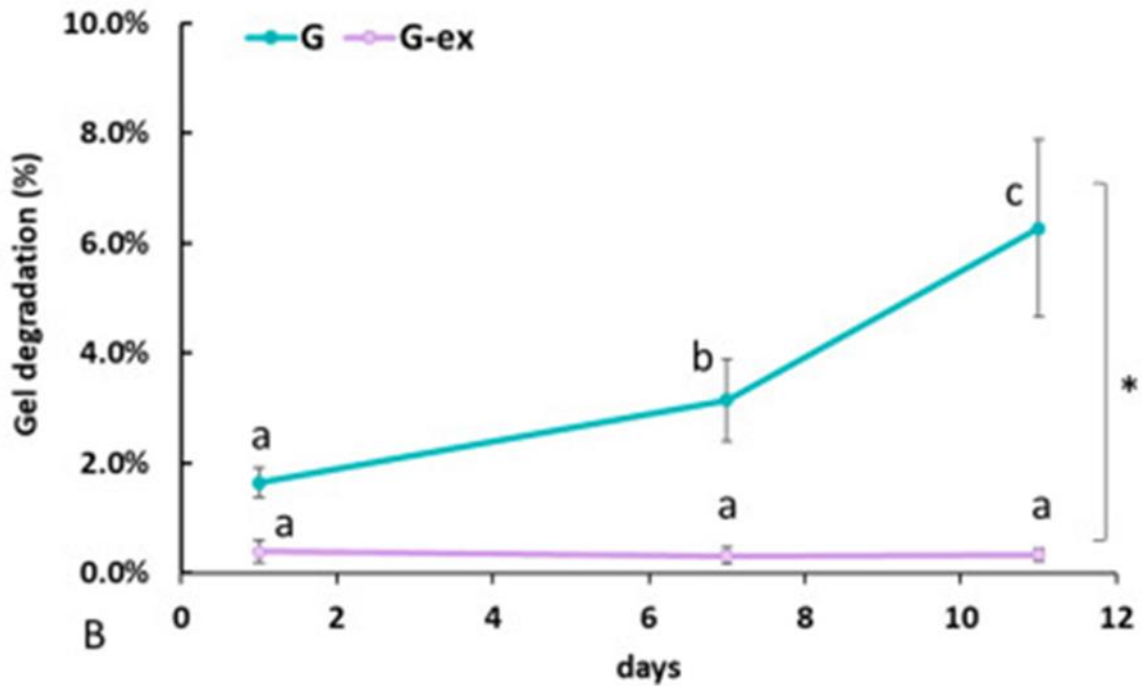


Fig. 10: confronto tra la degradazione di G (grafico celeste) e di G-ex (grafico viola)

Per quanto riguarda la viscoelasticità, in G-ex è aumentata in modo significativo, restando invece quasi costante in G. Nel corso della ricerca, i gel hanno progressivamente perso la loro capacità di mantenere la forma, sicché l'undicesimo giorno le ricercatrici non hanno potuto effettuare ulteriori test meccanici.

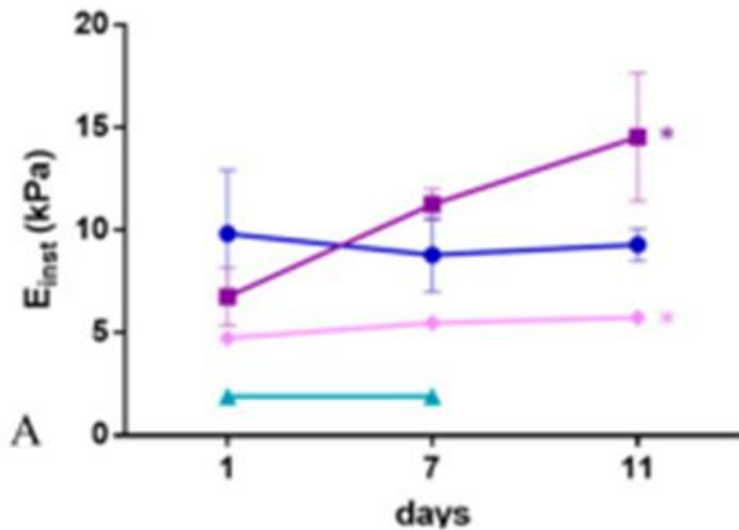


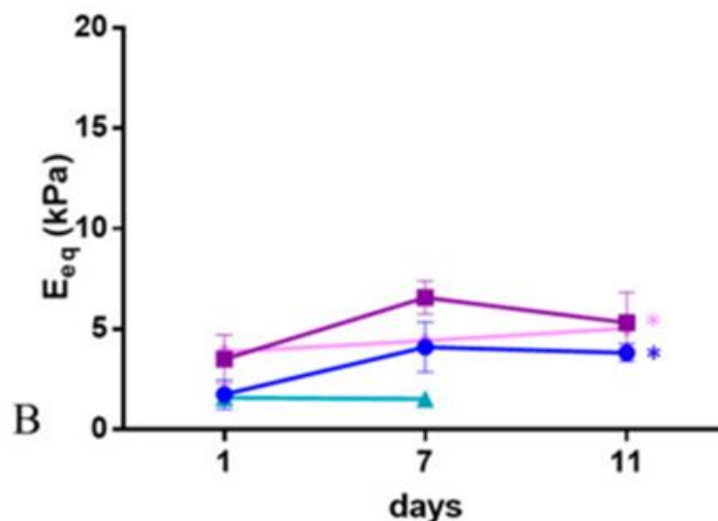
Fig. 11: Viscosità istantanea in CG-ex (grafico viola), in CG (grafico blu), in G-ex (grafico rosa) e in G (grafico celeste)

I moduli di equilibrio evidenziano la degradazione dei gel colturali: in presenza di cellule, i campioni CG-ex e CG presentano generalmente moduli più elevati rispetto ai campioni G-ex e G. Inoltre, i gel CG-ex hanno un

modulo maggiore rispetto al CG, chiaramente a causa della reticolazione esogena di mTG.

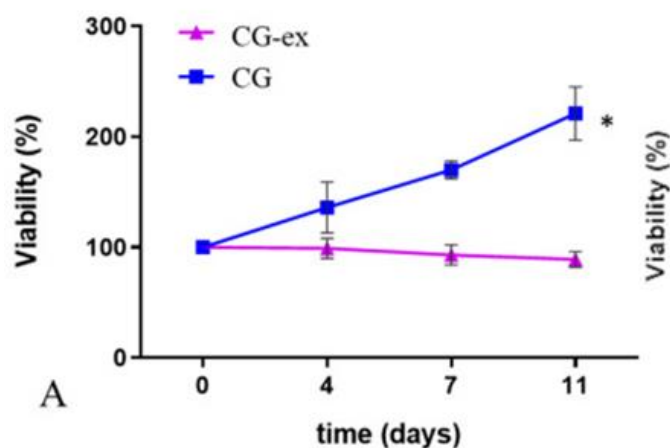
È stato rilevato, infine, che nei gel CG E_{inst} non varia nel tempo, mentre E_{eq} presenta un andamento crescente dal giorno 1 al giorno 7.

Fig. 12: Degradazione dei gel CG-ex (grafico viola), in CG (grafico blu), in G-ex (grafico rosa) e in G (grafico celeste).



Nei gel CG la vitalità cellulare aumenta nel tempo, mentre non subisce cambiamenti significativi nei gel CG-ex (dove c'è la presenza di mTG esogena). Per quanto riguarda la valutazione della citotossicità dell'mTG, non si osservano differenze significative nella vitalità tra cellule coltivate in presenza (M-ex) o assenza (M) di mTG esogena.

Fig. 13: Vitalità cellulare in CG-ex (grafico rosa) e in CG (grafico blu).



Le immagini acquisite col microscopio confocale evidenziano la maggiore vitalità delle cellule nei gel CG.

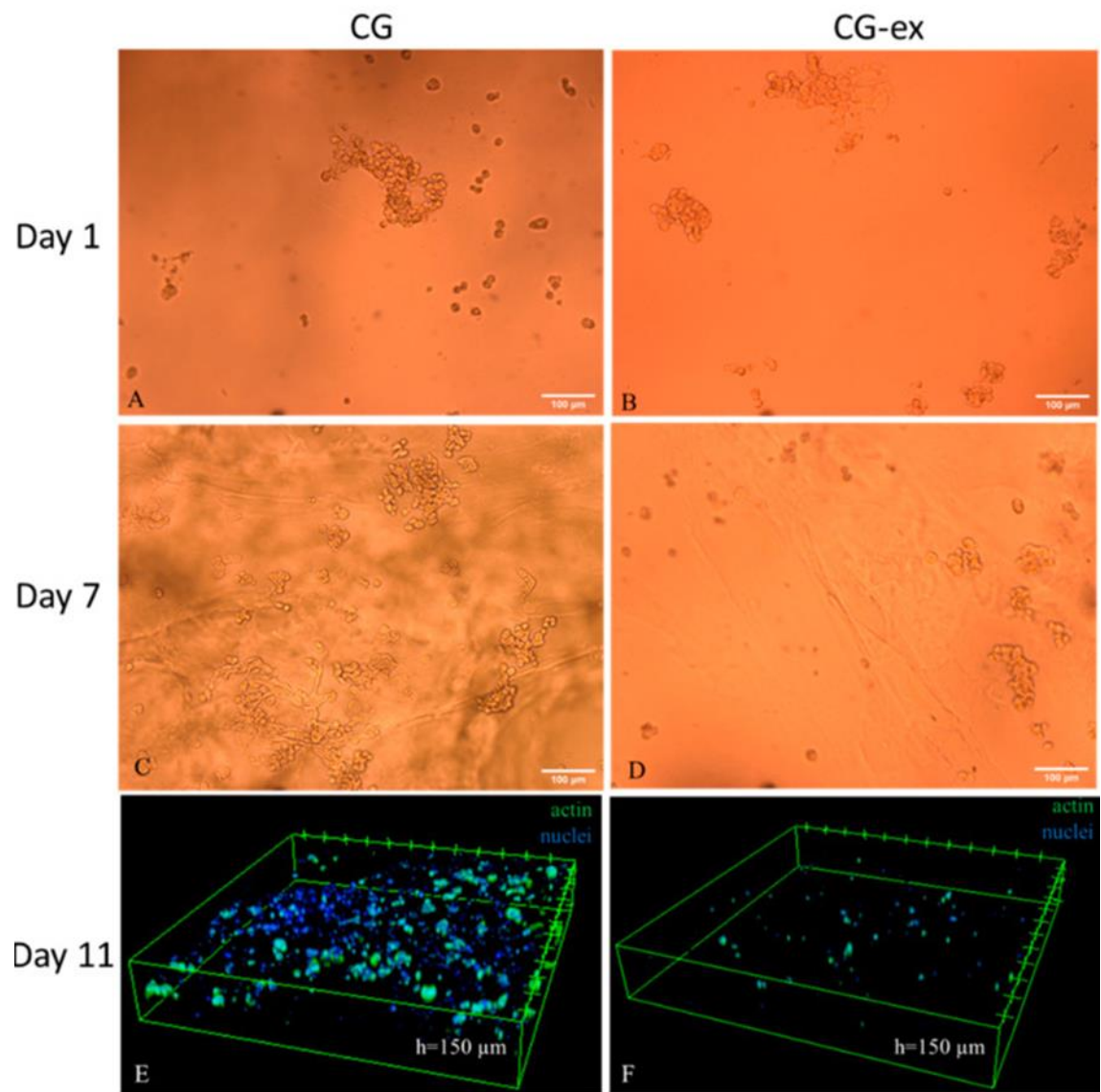


Fig. 14: Presenza di cellule vitali in Cg e CG-ex il primo giorno (A e B), il settimo giorno (C e D) e l'undicesimo giorno (E ed F).

2.7 Conclusioni

La reingegnerizzazione del bioreattore ha permesso di monitorare in condizioni di citocompatibilità il comportamento meccanico dei costrutti cellulari senza danneggiare le cellule o il materiale colturale.

Gli idrogel di gelatina reticolata con mTG endogena possono essere resi più rigidi con l'aggiunta di mTG esogena e la ricerca conferma che la seconda fase della reticolazione simula efficacemente l'aumento di rigidità e di viscosità del fegato correlato ai processi fibrotici che si verificano quando aumenta la quantità di ECM e la reticolazione (Snedeker e Gautieri, 2019). In realtà, la reticolazione con mTG endogena non è sufficiente per superare fenomeni concorrenti, come l'idrolisi (Mattei et al., 2020).

In assenza di mTG esogena, la vitalità cellulare cresce costantemente nel tempo, più che raddoppiando dopo 11 giorni nel CG. Al contrario, la vitalità cellulare non aumenta in presenza dell'enzima esogeno (CG-ex).

Poiché la vitalità cellulare nei monostrati coltivati con e senza mTG esogena (M-ex e M) è risultata identica, si può presumere che l'mTG esogena non abbia effetti citotossici alle concentrazioni utilizzate (100 U/g).

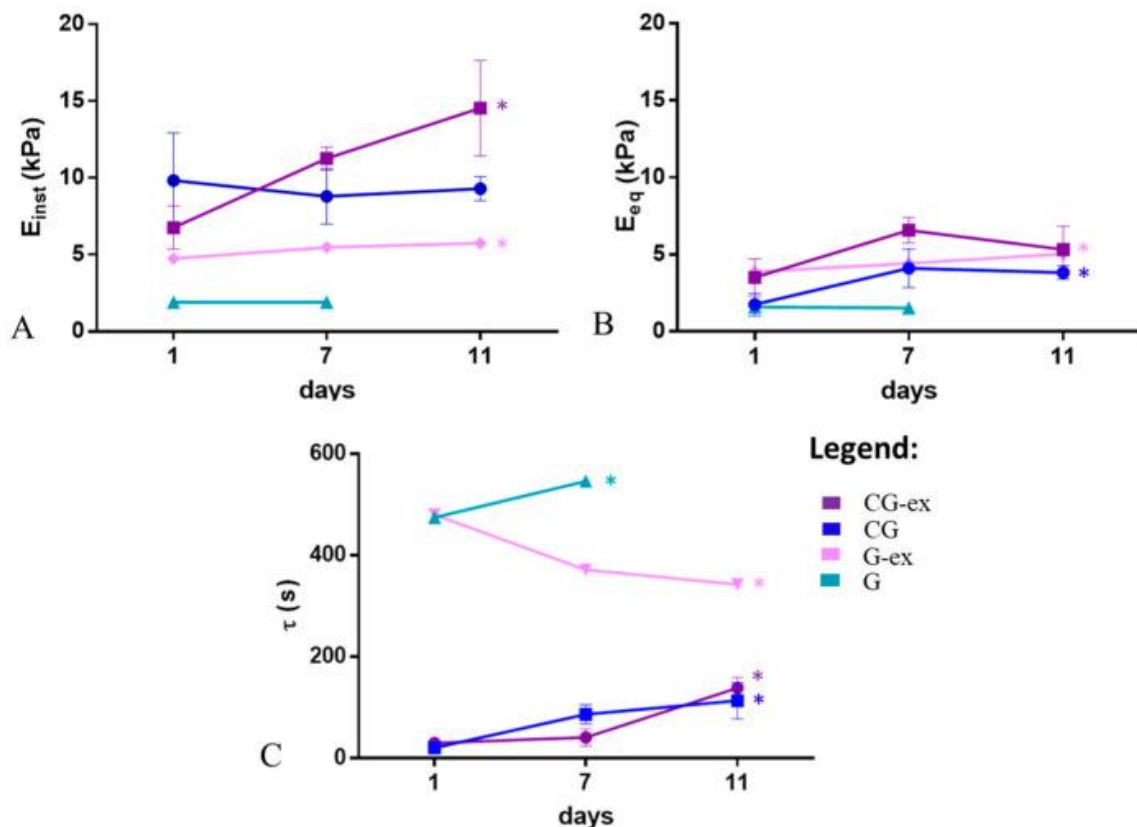
Tuttavia, la reticolazione non influisce solo sulle proprietà meccaniche, ma anche sulla permeabilità del gel e nel caso di un sistema di coltura 3D, così come *in vivo*, questi effetti sono sempre correlati e da studiare adeguatamente (Lin e Anseth, 2009). In futuro, quindi, l'uso di cellule "più meccanosensibili", come quelle epatiche primarie, e analisi cellulari più specifiche (ad esempio, secrezione di albumina e urea) sarà importante per perfezionare il modello.

Lo spostamento verso un comportamento più solido dei materiali in presenza di cellule dipende probabilmente anche dalla produzione di una propria matrice da parte delle cellule stesse, il che contrasta l'idrolisi del gel (Caliari e Burdick, 2016).

Questa ricerca rappresenta un primo passo verso lo sviluppo di modelli fisiologicamente rilevanti, utili per comprendere la meccanobiologia della fibrosi. Infatti, a differenza di altri metodi che includono fasi di reticolazione basate su reticolanti chimici citotossici, in questo caso la coltura cellulare in condizioni 3D è avvenuta con un enzima biocompatibile.

Lo studio di Cacopardo e Ahluwalia riassume i processi fisiopatologici in cui le proprietà elastiche e viscosi aumentano nel tempo e questo approccio può essere implementato per modellare altri fenomeni, come l'embriogenesi e la crescita delle cellule in condizioni di differenziazione e sintesi di ECM e in fase di aumento di rigidità, densità e reticolazione dei tessuti insieme a una diminuzione della fluidità nel tempo.

È sperabile che si possano mettere a punto farmaci antifibrotici che intervengano nel processo fibrotico a priori invece di agire a posteriori sui tessuti fibrotici o sull'inibizione della sintomatologia post fibrotica.



BIBLIOGRAFIA

Asbach P., Klatt D., Hamhaber U., Braun, J., Somasundaram, R., Hamm B., Sack I. Assessment of liver viscoelasticity using, multifrequency MR elastography. (2008). *Magn. Reson. Med.* 60, 373–379.

Bedossa P., Paradis V. Liver extracellular matrix in health and disease. *J. Pathol.* 2003;200:504–515.

Benvegna L., Gios M., Boccato S., Alberti A. Natural history of compensated viral cirrosi: a propsective study on the incidence and hierarchy of major complications. (2004). *Gut*; 53: 744-9.

Caliari S., Burdick J.A. A practical guide to hydrogels for cell culture. *Nat. Methods.* 2016;13:405–414.

Caliari S., Perepelyuk M., Cosgrove B.D., Tsai S.J., Lee G.Y., Mauck R., Wells R.G., Burdick J.A. Stiffening hydrogels for investigating the dynamics of hepatic stellate cell mechanotransduction during myofibroblast activation. (2016). *Sci. Rep.* 6, 21387.

Cassiman D., Libbrecht L., Desmet V., Denef C., Roskams T. Hepatic stellate cells express neurotrophins and neurotrophin receptors. (2001). *Hepatology*; 33: 148-58.

Chojkier M., Lyche H. D., Filip M. Increased production of collagen in vivo by hepatocytes and nonparenchymal cells in rats with carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis. (1988). *Hepatology*; 8: 808-14.

Cox T.R., Erler J.T. Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: Implications for fibrotic diseases and cancer. *Dis. Model. Mech.* 2011;4:165–178.

De Minicis S., Bataller R., Brenner DA. NADPH oxidase in the liver: defensive, offensive, or fibrogenic? (2006). *Gastroenterology*; 131: 272-5.

De Minicis S., Candelaresi C., Marzioni M. *et al.* Role of endogenous opioids in modulating HSC activity in vitro and liver fibrosis in vivo. (2008). *Gut*; 57: 352-64.

Del Raso N.J. *In vitro* methodologies for enhanced toxicity testing. (1993). *Toxicol. Lett.*, 68, 91–99.

Friedman S. L., Roll F. J., Boyles J., Bissel D. M. Hepatic lipocytes: the principal collagen-producing cells of normal rat liver. (1985). *Proc Natl Acad Sci USA*; 82: 8681-5.

Gabele E., Brenner D. A., Rippe R. A. Liver fibrosis: signals leading to the amplification of the fibrogenic hepatic stellate cell. (2003) *Front Biosci*; 8: d69-77.

Grassi F., Negrini D., Porro C. A. *Fisiologia umana*. (2015). Poletto; 936.

Guo J., Friedman S. L. Hepatic fibrogenesis. (2007). *Semin Liver Dis*; 27: 413-26.

Guvendiren M., Perepelyuk M., Wells R.G., Burdick J.A. Hydrogels with differential and patterned mechanics to study stiffness-mediated myofibroblastic differentiation of hepatic stellate cells. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 2014;38:198–208.

Guvendiren M., Perepelyuk M., Wells R.G., Burdick J.A. Hydrogels with differential and patterned mechanics to study stiffness-mediated myofibroblastic differentiation of hepatic stellate cells. (2014). *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 38, 198–208.

Haak, A. J., Kostallari, E., Sicard, D., Ligresti, G., Choi, K. M., Caporarello, N., ... & Tschumperlin, D. J. (2019). Selective YAP/TAZ inhibition in

fibroblasts via dopamine receptor D1 agonism reverses fibrosis. *Science translational medicine*, 11(516), eaau6296.

Hansen L., Wilhelm J., Fassett J. Regulation of Hepatocyte Cell Cycle Progression and Differentiation by Type I Collagen Structure. (2005). *Curr. Top. Dev. Biol.*, 72, 205–236.

Hennink W.E., Nostrum C.F. Van Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2012;64:223–236.

Hoffman A.S. Hydrogels for biomedical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2012;64:18–23.

Holmes A. M., S. Creton and K.Chapman Working in partnership to advance the 3Rs in toxicity testing, *Toxicology*, 2010, 267, 14–19, N. R. Council *Toxicity Testing in the 21st century: A Vision and a Strategy*, National Academy Press, Washington, DC, 2007.

Hui E., Gimeno K.I., Guan G., Caliri S.R. Spatial control of viscoelasticity in phototunable hyaluronic acid hydrogels. (2019). *bioRxiv*, 646778.

Judson R., Richard A., Dix D.J., Houck K., Martin M., Kavlock R., Dellarco V., Henry T., Holderman T., Sayre P., Tan S., Carpenter T., Smith E. The toxicity data landscape for environmental chemicals. (2009). *Environ. Health Perspect.* 117, 685–695.

Kalluri R., Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. (2003). *J Clin Invest*; 112: 1776-84.

Kisseleva T., Uchinami H., Feirt N., *et al.* Bone marrow-derived fibrocytes participate in pathogenesis of liver fibrosis. (2006). *J Hepatol*; 45: 429-38.

Kisseleva T., Brenner D. A. Mechanism of fibrogenesis. (2008). *Exp Biol Med (Maywood)*; 233: 109-22.

Le Cluyse E. L., Bullock P. L., Parkinson A. Strategies for restoration and maintenance of normal hepatic structure and function in long-term cultures of rat hepatocytes. (1996). *Adv. Drug Delivery Rev.*, 22, 133–186.

Lin C.-C., Anseth KS PEG Hydrogels for the Controlled Release of Biomolecules in Regenerative Medicine. *Farma. ris.* 2009; 26 :631–643.

Maher J.J., Bissel D.M., Friedman S.L., Roll F.J. Collagen measured in primary cultures of normal rat hepatocytes derives from lipocyte within the monolayer. (1988). *J Clin Invest*; 82: 450-9.

Martini F. H., Tallitsch R. B., Nath J. L. Anatomia umana. (2019). EdiSES Università s.r.l.- VII edizione, Napoli; 858.

Mastrorocco A., Cacopardo L., Martino N.A., Fanelli D., Camillo F., Ciani E., *et al.* One-step automated bioprinting-based method for cumulus-oocyte complex microencapsulation for 3D *in vitro* maturation. (2020).

Mather J.J., Mcguire R.F. Extracellular matrix gene expression increases preferentially in rat lipocytes and sinusoidal endothelial cells during hepatic fibrosis in vivo. (1990). *J Clin Invest*; 86: 1641-8.

Mattei G., Cacopardo L., Ahluwalia A.A. Engineering Gels with Time-Evolving Viscoelasticity. (2020). *Materials*, 13, 438.

Mattei G., Cacopardo L., Ahluwalia AA Engineering Gels with Time-Evolving Viscoelasticity. *Materiali*. 2020; 13 :438. doi: 10.3390/ma13020438.

Mattei G., Cacopardo L., Ahluwalia AA Engineering Gels with Time-Evolving Viscoelasticity. *Materiali*. 2020; 13 :438.

Mattei G., Cacopardo L., Ahluwalia AA Engineering Gels with Time-Evolving Viscoelasticity. *Materiali*. 2020; 13 :438.

Mogler, C., Wieland, M., König, C., Hu, J., Runge, A., Korn, C., ... & Augustin, H. G. (2015). Hepatic stellate cell-expressed endosialin balances fibrogenesis

and hepatocyte proliferation during liver damage. *EMBO molecular medicine*, 7(3), 332-338.

Moore B.B., Kolodsick J.E., Thannickal V.J., *et al.* CCR2-mediated recruitment of fibrocytes to the alveolar space after fibrotic injury. (2005) *Am J Pathol*; 166: 675-84.

Oben J.A., Yang S., Lin H., Ono M., Diehl A. M. Norepinephrine and neuropeptide Y promote proliferation and collagen gene expression of hepatic myofibroblastic stellate cells. (2003). *Biochem Biophys Res Commun*; 302:685-90.

Parola, M. (2020). Fibrosi e cirrosi epatica: risoluzione o regressione... questo è il dilemma. www.readfiles.it, 12, 40.)

Peifer M., McEwen D. G. The ballet of morphogenesis: unveiling the hidden choreographers. (2002). *Cell*; 109: 271-4.

Popper H., Uenfriend S. Hepatic fibrosis. Correlation of biochemical and morphologic investigations. (1970). *Am J Med*; 49: 707-21.

Ravi M., Paramesh V., Kaviya S., Anuradha E., Solomon F.P. 3D Cell Culture Systems: Advantages and Applications. (2015). *J. Cell. Physiol.* 230, 16–26.

Roskams T., Theise N. D., Balabaud C., *et al.* Nomenclature of the finer branches of the biliary tree: canals, ductules, and ductular reactions in human livers. (2004). *Hepatology*; 39: 1739-45.

Sato M., Suzuki S., Senoo H. Hepatic stellate cells: unique characteristics in cell biology and phenotype. (2003). *Cell Struct Funct*; 28: 105-12.

Seki E., De Minicis S., Osterreicher C. H., *et al.* TLR4 enhances TGF-beta signalling and hepatic fibrosis. (2007). *Nat Med*; 13: 1324-32.

Snedeker J.G., Gautieri A. The role of collagen crosslinks in ageing and diabetes - The good, the bad, and the ugly. *Muscle Ligaments Tendons J.* 2019;4:303–308.

- Snedeker J.G., Gautieri A. The role of collagen crosslinks in ageing and diabetes - The good, the bad, and the ugly. (2019). *Muscle Ligaments Tendons J.*; 4, 303–308.
- Soldatow V. Y., LeCluyse E. L., Griffith L. G., Rusyn I. *In vitro* models for liver toxicity testing. (2013). *Toxicology Research*, Volume 2, Issue 1, Pages 23–39.
- Sun K., Kusminski C.M., Scherer P.E. Adipose tissue remodeling and obesity. (2011). *J. Clin. Investig.*; 121, 2094–210.
- Svegliati-Baroni G., De Minicis S., Marzioni M. Hepatic fibrogenesis in response to chronic liver injury: novel insight on the role of cell-to-cell interaction and transition. (2008). *Liver Int.*; 28(8): 1052-64. Review.
- Svegliati-Baroni G., Saccomanno S., van Goor H., Jansen P., Benedetti A., Moshage H. Involvement of reactive oxygen species and nitric oxide radicals in activation and proliferation of rat hepatic stellate cells. (2001). *Liver*; 21: 1-12.
- Thiery J. P., Sleeman J. P. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. (2006). *Nat Rev Mol Cell Biol*; 7: 1331-42.
- Uriz J., Gines P., Ortega R., *et al.* Increased plasma levels of neuropeptide Y in hepatorenal syndrome. (2002). *J Hepatol*; 36: 349-55.
- Van De Bovenkamp M., Groothuis G., Meijer D., Olinga P. Liver fibrosis in vitro: Cell culture models and precision-cut liver slices. (2007). *Toxicol. Vitro*, 21, 545–557.
- Yeh W.C. Elastic modulus measurements of human liver and correlation with pathology. *Ultrasound Med. Biol.* 2002; 28:467–474.
- Yeh W.C. Elastic modulus measurements of human liver and correlation with pathology. (2002). *Ultrasound Med. Biol.*, 28, 467–474.

Yin M., Talwalkar J.A., Glaser K.J., Manduca A., Grimm R.C., Rossman P.J., Fidler J.L., Ehman R.L. Assessment of Hepatic Fibrosis with Magnetic Resonance Elastography. (2007). *Clin. Gastroenterol. Hepatol*, 5, 1207–1213.

Zavadil J., Böttinger E. P. TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transition. (2005). *Oncogene*; 5764-74; 17.